

UNIVERSITE DE LYON

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1966 - N° 525

**Contribution à l'étude du dosage
des cholinestérases sanguines
Son application au cours des traitements
de l'hypodermose bovine
par de nouveaux composés organophosphorés**

THÈSE

pour le DOCTORAT de l'UNIVERSITE de LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

devant la FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

le 26 Janvier 1966

par

CARTIER Henri - Jean

né le 11 Janvier 1937

à CHALON sur SAONE



F. ANDRE
5 rue Bugeaud
LYON

UNIVERSITE DE LYON

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1966 - N° 525

**Contribution à l'étude du dosage
des cholinestérases sanguines**
**Son application au cours des traitements
de l'hypodermose bovine
par de nouveaux composés organophosphorés**

T H È S E

pour le DOCTORAT de l'UNIVERSITE de LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

devant la FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

le 26 Janvier 1966

par

CARTIER Henri - Jean

né le 11 Janvier 1937

à CHALON sur SAONE



F. ANDRE
5 rue Bugeaud
LYON

P E R S O N N E L D E L A F A C U L T E

Doyens Honoraires :

M. J. LEPINE - Membre de l'Institut
M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen : M. J.F. CIER

Assesseurs : M. M. LEVRAT
M. L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL - LEPINE - TRILLAT - MOURIQUAND - GARIN - GATE - MARTIN - GABRIELLE -
SANTY - DUCLOS - GUILLEMINET - HERMANN - ROCHET - POLLOSSON.

PROFESSEURS

MM. CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique
DECHAUME	Clinique Neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine Légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-rhino-laryngologie et d'audio- phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-ptisiologie

MM. GREYSSEL

DARGENT
GUICHARD
GIRARD Paul
LATARJET
PEYCELON
GIRARD Marcel
VACHON
GALY
PAPILLON
JEUNE
GONIN
MONNET
BANSSILLON
CHATONNET
GUINET
TRILLAT
FREIDEL
MARION Joseph
DORCHE
DUMONT Louis
PERROT
CIER J.F.
PERRIN J.
MICHAUD Pierre
MATHIEU
FAUCON
BERTOYE
VINCENT D.
CIER André
X.....
X.....
X.....
X.....

Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique
Clinique carcinologique
Anatomie pathologique
Pathologie générale et expérimentale
Anatomie
Pathologie chirurgicale
Clinique médicale D
Pathologie médicale
Physio-pathologie des voies respiratoires
Radiologie
Clinique médicale infantile et hygiène du 1er âge
Thérapeutique
Bactériologie
Physiologie et pathologie obstétricales
Physiologie B
Clinique endocrinologique
Clinique de chirurgie orthopédique
Clinique stomatologique
Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
Matière médicale et législation pharmaceutique
Histologie et embryologie
Chimie
Physiologie A
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
Clinique de chirurgie cardiaque
Clinique gynécologique
Biologie médicale et pharmacodynamie
Clinique des maladies infectieuses
Biochimie appliquée
Pharmacodynamie
Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
Chimie biologique et médicale
Clinique médicale infantile
Clinique chirurgicale B

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER
MANSUY
COLLET
LACROIX
LIARAS

Physique nucléaire appliquée à la médecine
Neuro-chirurgie
Chimie générale et pharmaceutique
Hygiène et climatologie
Clinique chirurgicale propédeutique

MM. LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL	Médecine générale
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
PONT Maurice	Médecine générale
TRAEGER	Pathologie métabolique et rénale

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ROMAN	Parasitologie
FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique biologique
ODDOUX	Botanique et cryptogamie
De SOLLIERS	Chimie analytique
DESPIERRES	Médecine générale
GARIN	Parasitologie
TOLOT	Médecine du travail
THIVOLET	Hygiène

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

MM. CREYSSSEL Roger	Chimie biologique
PINET	Electro-radiologie
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
DESCOTES	Chirurgie expérimentale
JOUVET	Pathologie expérimentale
PEYRIN	Physique biologique
TOMMASI	Anatomie pathologique
BUFFARD	Electro-radiologie
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
De MOURGUES F.	Stomatologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
REBOUILLAT	Chirurgie générale
ROMAGNY	Pédiatrie
DELAHAYE	Médecine générale
DELEUZE	Anesthésiologie
GIRAUD	Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique
MICHEZ	Anesthésiologie
FRANCOIS	Pédiatrie et Puériculture
MICHOULIER	Chirurgie générale
COLOMB	Dermatologie
LAMBERT	Médecine générale
FRIES	Médecine générale
GILLY	Pédiatrie
ROBERT	Médecine générale
BOUCHET	Anatomie

MM. BETHENOD	Pédiatrie
GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
KALB	Pneumo-phthisiologie
LARBRE	Pédiatrie
SOUSTELLE	Chirurgie générale
VIALA	Médecine générale
VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
GIROD	Histologie et Embryologie
GRAS	Chimie biologique
MALLEIN	Chimie analytique
COLIN	Médecine Légale
BERTRAND	Chimie biologique
MARET	Chirurgie générale
VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

MM. FAVRE-GILLY	Hématologie
RIFTAT	Hygiène
FLANDROIS	Physiologie
ROLLET	Pharmacie galénique
FLEURETTE	Bactériologie

AGREGES EN EXERCICE

MM. MARION Pierre	Chirurgie générale
BONAMOUR	Ophtalmologie
De MOURGUES Georges	Chirurgie générale
DEVIC	Médecine générale
DUMONT Martial	Obstétrique
DURAND	Urologie
FRANCILLON	Chirurgie générale
SAUBIER	Chirurgie générale
SCHOTT	Neuro-psychiatrie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie
CHASSARD	Electro-radiologie
FAYSSE	Orthopédie
GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
GARDE	Médecine générale
HUGONNIER	Ophtalmologie
MORNEX	Médecine générale
MOUNIER-KUHN Alain	Chirurgie générale
NORMAND	Médecine générale
PERRIN André	Médecine générale
DUMAS	Stomatologie
GARMIER	Obstétrique
NOEL	Médecine générale
SCHNEPP	Orthopédie
NOTTER	Gynécologie obstétricale

Examineurs de la Thèse :

- Président : M. le Professeur CHAMBON
 - Assesseurs : M.M. ROCHE
PERROT
TAPERNOUX
-



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553403_0033

A MES PARENTS

En témoignage de ma profonde reconnaissance et de ma plus
tendre affection.

A TOUS MES PARENTS ET AMIS.

A notre Maître et Président de Thèse

Monsieur le Professeur M. CHAMBON

Officier de la Légion d'Honneur

Professeur de Chimie Organique et de Toxicologie

Qui a bien voulu nous donner le sujet de ce travail et nous
a prodigué ses précieux conseils et ses encouragements.

Avec nos respectueux remerciements, nous le prions d'accepter
nos sentiments de déférente gratitude.

A Monsieur le Professeur L. ROCHE
Professeur de Médecine Légale et de Déontologie

A Monsieur le Professeur L. PERROT
Professeur de Chimie
Pharmacien - Chef des Hopitaux

Qui nous ont fait l'honneur de bien vouloir juger notre travail.

Nous les prions de trouver ici l'expression de nos respectueux remerciements et de toute notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur A. TAPERNOUX
Officier de la Légion d'Honneur
Directeur Honoraire de l'Ecole Vétérinaire
Professeur de Pharmacie et de Toxicologie à l'Ecole Vétérinaire.
Directeur Général du Centre Technique du Cuir

En nous donnant le moyen de réaliser nos expériences sur les bovidés, il nous a permis la réalisation d'une partie importante de notre travail, et nous a fait l'honneur d'avoir bien voulu accepter de faire partie de notre jury de thèse.

Nous le prions de trouver ici l'expression de nos respectueux remerciements et de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur A. MAGAT
Professeur de Physique et de Chimie biologique médicale à l'Ecole Vétérinaire.

Pour les précieux conseils qu'il nous a donnés, et la contribution qu'il a bien voulu apporter à notre travail,
Nous lui adressons nos respectueux remerciements.

A Madame R. MARTINI
Docteur en Pharmacie
Assistante au Laboratoire de Chimie Organique et de Toxicologie

Avec nos hommages respectueux, nous lui adressons nos remerciements
chaleureux pour la collaboration concrète qu'elle nous a apportée lors
de la réalisation de ce travail.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DOSAGE DES CHOLINESTERASES SANGUINES
SON APPLICATION AU COURS DES TRAITEMENTS DE L'HYPODERMOSE BOVINE
PAR DE NOUVEAUX COMPOSES ORGANOPHOSPHORES

INTRODUCTION

Les composés organophosphorés, puissants inhibiteurs des cholinestérases, sont connus depuis longtemps et ont vu leurs utilisations se développer au cours des 30 dernières années. Ils furent employés d'abord comme insecticides dans le règne végétal en remplacement de la nicotine. Plus récemment ont été synthétisées des molécules de la même famille, qui se révélèrent utilisables pour combattre des maladies parasitaires chez les animaux, entre autres l'hypodermose bovine.

Cette affection qui n'est pas mortelle a pour effet de ralentir la croissance des jeunes bovins et surtout de causer de graves dégâts à leur cuir. En effet, la larve d'hypoderme ou varron perce un trou dans la peau par lequel elle sortira avant de se transformer en nymphe. Il en résulte que le cuir provenant des animaux parasités sera de qualité inférieure, voire même inutilisable.

C'est pourquoi les Services Vétérinaires et les Centres de Recherches des Industries du Cuir ont fait de nombreuses recherches pour trouver l'organophosphoré qui aurait une activité de 100 % vis à vis des larves d'hypoderme, tout en étant très peu toxique. Les expérimentations réalisées à ce sujet ont fait l'objet d'un nombre important de publications.

Parmi les produits essayés, aucun ne s'est révélé dénué de toxicité. Appliqués sur une grande échelle, ils ont donné lieu quelquefois à des accidents, ce qui a empêché la généralisation des traitements antivarron au moyen des composés organophosphorés.

Il apparaît donc que du point de vue toxicologique général, l'usage agricole de ces produits présente un risque tant à l'égard des manipulateurs que des animaux traités ou avoisinants.

C'est à ce problème que nous nous sommes intéressés, et en premier lieu à la détection de leur pénétration dans l'organisme, décelable par l'inhibition plus ou moins grande des cholinestérases.

Notre premier but était donc de sélectionner parmi les méthodes publiées celles qui s'avéraient les plus sûres et les plus aisées à réaliser, susceptibles de déterminer l'activité des cholinestérases "vraies" globulaires et des pseudo cholinestérases plasmatiques.

Nous pouvions alors penser à suivre expérimentalement l'influence de quelques organophosphorés antivarron appliqués à l'animal sur le degré d'intoxication révélé par l'abaissement des cholinestérases.

Nous nous sommes largement inspirés des travaux de Monsieur le Professeur TAPERNOUX, Directeur Général du Centre Technique du Cuir à LYON, et Professeur de Toxicologie à l'Ecole Vétérinaire, et de Monsieur le Professeur MAGAT, titulaire de la Chaire de Physique et de Chimie Biologique à l'Ecole Vétérinaire. Ils nous ont apporté une aide particulièrement importante pour la mise en oeuvre de notre travail sur les bovidés de la Ferme expérimentale du Centre Technique du Cuir à VILLARS les DOMBES. Nous tenons à leur exprimer notre très respectueuse gratitude et notre sincère reconnaissance.

Pensant examiner les taux normaux des cholinestérases de quelques animaux domestiques, tel que le chien, nous fumes amenés à élargir cette investigation étant donné les niveaux très dissemblables des cholinestérases globulaires et plasmatiques observés lors de nos premières enquêtes.

Nous avons adopté le plan de travail suivant :

PLAN DE L'EXPOSE

INTRODUCTION

TRAVAUX ANTERIEURS

PREMIER CHAPITRE

Les esters de la choline. Les cholinestérases et leurs inhibiteurs.

- I Les esters de la choline : principales propriétés.
- II Les cholinestérases.
- III Les inhibiteurs des cholinestérases. Inhibiteurs réversibles et irréversibles.
- IV Les composés organophosphorés.
 - a) Historique.
 - b) Classification et propriétés physicochimiques.
 - c) Action physiologique.

DEUXIEME CHAPITRE

Toxicologie des composés organophosphorés.

- I Toxicité et symptômes d'intoxication.
- II Réactivation des cholinestérases après inhibition par les organophosphorés :
 - 1) spontanée
 - 2) par agents chimiques
- III Traitement des intoxications.
- IV Prophylaxie.

TROISIEME CHAPITRE

Le dosage des cholinestérases dans le sang.

- I Conditions requises.
- II Techniques utilisées.
- III Valeur des diverses méthodes.

QUATRIEME CHAPITRE

L'hypodermose bovine .

- I Historique .
- II Cycle de l'hypoderme .
- III Dégâts causés par le parasite .

CINQUIEME CHAPITRE

La lutte contre le varron .

- I Généralités .
- II Les diverses méthodes de traitement .

SIXIEME CHAPITRE

Emploi d'insecticides organophosphorés dans la lutte contre le varron .

- I Parathion.
- II Trichlorfon.
- III Etrolène.
- IV Diméthoate (Rogor).
- V 13.072 R.P.

SEPTIEME CHAPITRE

L'hypodermose chez l'homme :

TRAVAIL EXPERIMENTAL

PREMIER CHAPITRE

Etude analytique des méthodes de dosage des cholinestérases

- I Méthode manométrique :
- 1) description de l'appareil de WARBURG et technique de manipulation .
 - 2) expérience acide acétique-bicarbonate.
Influence du pH.
 - 3) influence du plasma et des globules rouges sur la rétention de CO_2 .
 - 4) Dosage des cholinestérases sanguines. Méthode directe et sur taches de sang desséché.
 - 5) Cinétique de la réaction enzymatique .
- II Méthodes colorimétriques :
- 1) Description des divers modes opératoires .
 - 2) Etude comparative de ces méthodes, parallèlement à la technique manométrique .
 - 3) Influence du Diparcol sur les cholinestérases globulaires et plasmatiques.
 - 4) Méthode sur sang desséché.
- III Temps de manipulation requis pour les méthodes choisies .

DEUXIEME CHAPITRE

Comparaison des taux de cholinestérases de l'homme et de quelques espèces animales .

TROISIEME CHAPITRE

Etude du pouvoir anticholinestérasique des composés organophosphorés utilisés dans la lutte contre le varron .

- I Chez le chien :
- 1) Rogor .
 - 2) Trichlorfon .
- II Chez les bovidés :
- 1) Taux de cholinestérases 3 mois après un traitement par le Rogor et le Trichlorfon avec compte de varrons.
 - 2) Traitements par divers composés organophosphorés .

a- Trichlorfon	}	par voie percutanée .
b- Parathion		
c- 13.072 R.P.		
d- Rogor		par voie parentérale .
 - 3) Action des antidotes.

DISCUSSION

CONCLUSIONS

TRAVAUX ANTERIEURS

PREMIER CHAPITRE

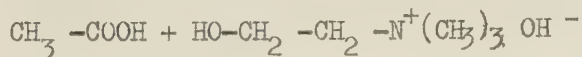
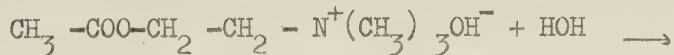
LES ESTERS DE LA CHOLINE. LES CHOLINESTERASES ET LEURS INHIBITEURS.

I. Les esters de la choline. Principales propriétés chimiques et rôle physiologique. (65)

Parmi les divers esters de la choline rencontrés chez les êtres vivants, l'acétylcholine est le plus anciennement connu. Elle a été découverte en 1914 dans l'Ergot de seigle par EWINS (39). En 1929, DALE et DUDNEY (26) la retrouvent dans la rate du cheval, puis en 1933, CHANG et GADDUM (21) dans le placenta humain. Depuis de nombreux chercheurs ont pu la mettre en évidence dans les tissus et liquides de l'organisme ; cerveau, ganglions, intestin, coeur, rate, sang, aussi bien chez l'homme que chez les animaux vertébrés et invertébrés.

D'autres esters de la choline ont également été isolés dans lesquels le reste acétyl est remplacé par un radical provenant d'un autre acide : propionylcholine (12), butyrylcholine (60), etc.. Leur rôle physiologique est encore mal connu et nous limiterons notre étude à l'acétylcholine.

L'acétylcholine est hydrolysable en choline et acide acétique selon la réaction :



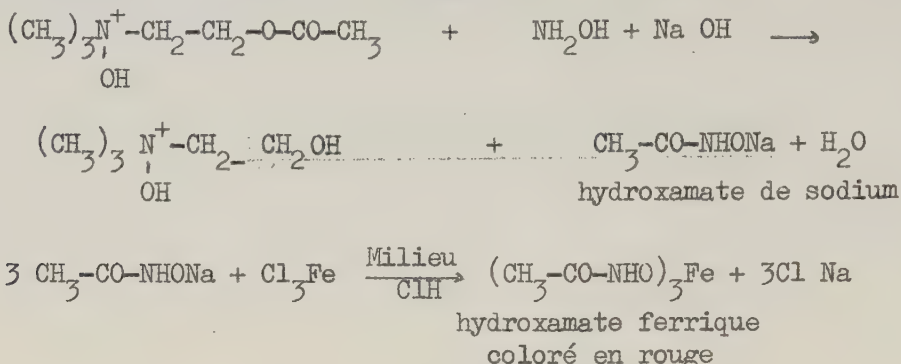
Ce processus peut se réaliser de deux façons :

- 1) spontanément, sous l'influence de la chaleur, en milieu fortement acide ou alcalin.
- 2) par l'intermédiaire d'un groupe particulier d'estérase : les cholinestérase.

Il en résulte que l'acétylcholine base est un corps qui s'hydrolyse très facilement. Par contre en milieu acide, elle forme des dérivés beaucoup plus

stables. Le plus utilisé est le chlorure, solide blanc cristallisé très soluble dans l'eau, mais très hygroscopique. On ne peut le conserver qu'en ampoules scellées.

En solution alcaline, l'acétylcholine, comme de nombreux esters, forme des hydroxamates en présence d'hydroxylamine. En présence de sels ferriques, ces composés donnent une coloration rouge. Cette propriété mise en évidence par HESTRIN (53) est à la base d'une méthode de dosage par colorimétrie.



L'acétylcholine joue un rôle physiologique important. (41,52,84). Elle est un médiateur chimique nécessaire à la transmission de l'influx nerveux. Son action s'exerce au niveau des synapses du système nerveux central, des ganglions autonomes, des fibres postganglionnaires qui commandent le muscle cardiaque et les fonctions sécrétoires, ainsi que des plaques motrices qui relient les nerfs aux muscles striés.

Autrefois appelée "hormone vagale" par LOEWI (70, 71), l'acétylcholine est un parasympatomimétique et provoque notamment le myosis, la diminution de la pression artérielle, l'augmentation des sécrétions et la contraction des muscles lisses du tube digestif.

Pour remplir son rôle de médiateur chimique, l'acétylcholine contenue dans les tissus doit pouvoir être libérée à la demande en quantité strictement nécessaire, et détruite dès qu'elle a rempli son rôle. Après son élimination, elle doit pouvoir être reconstituée rapidement de façon à assurer des transmissions répétées en réponse à des influx nerveux successifs.

D'autre part l'acétylcholine sert probablement d'hormone locale dans de nombreux organes effecteurs, dont les muscles striés. Elle intervient sur le cœur pour maintenir son excitabilité et son rythme. Elle joue aussi un rôle dans la perméabilité des membranes cellulaires.

La synthèse de l'acétylcholine est réalisée à partir de la choline et de l'acétylcoenzyme A sous l'action de la choline-acétylase (85), enzyme qui se trouve dans les axones des nerfs cholinergiques. D'autre part, la destruction de l'acétylcholine se réalise par hydrolyse sous l'action des cholinestérases.

II.- Les cholinestérases

Les cholinestérases ont été définies comme des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des esters de la choline. Au cours de ces 20 dernières années, de nombreux chercheurs ont étudié leur spécificité, leur rôle physiologique et l'importance pharmacologique de leurs inhibiteurs.

Les enzymes présents dans l'organisme de l'homme et des animaux hydrolysent les esters de la choline à vitesse vraiment élevée. Aucun enzyme étudié n'hydrolyse seulement les esters de la choline. D'autres esters sont également hydrolysés,

mais à vitesse beaucoup plus faible.

Les cholinestérases ont été découvertes en 1930 par PLATTNER et HINTNER (88) dans les tissus de tous les animaux. Mais ce n'est qu'en 1940 que ALLES et HAWES (7) démontrent que la cholinestérase du sérum humain diffère de celle des érythrocytes. L'étude a été reprise par MENDEL et RUDNEY (79) qui décrivent les caractères différentiels des 2 enzymes.

La cholinestérase "vraie", ou spécifique, ou acétylcholinestérase est contenue dans le système nerveux et se retrouve dans les globules rouges de l'homme et de tous les animaux. Vis à vis de l'acétylcholine, son activité optimum s'exerce pour une concentration en substrat très faible ($3.10^{-5}M$), tandis qu'une quantité excédentaire provoque des phénomènes d'inhibition.

La pseudocholinestérase, ou enzyme non spécifique, ou butyrylcholinestérase se trouve dans le plasma et les organes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Elle exerce son maximum d'action pour une concentration d'acétylcholine plus élevée ($2.10^{-2}M$) et n'est pas inhibée par un excès.

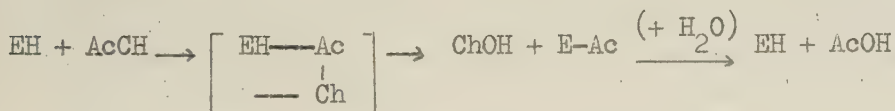
Récemment KALOW (63) a mis en évidence dans le sérum humain une cholinestérase "atypique", par action des inhibiteurs. Il a montré :

- que l'analogue de la prostigmine RO2-0683 est un inhibiteur 100 fois plus puissant pour la cholinestérase sérique normale que pour l'atypique.
- par mesure spectrophotométrique de la vitesse d'hydrolyse de la benzoylcholine $5.10^{-5}M$ par le sérum, avec ou sans Dibucaine $10^{-5}M$, et calcul du nombre Dibucaine (DN) qui est le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'estérase dans des conditions déterminées, que si la cholinestérase est atypique, le nombre Dibucaine est plus faible que si elle est normale.

Cette cholinestérase "atypique" dont les propriétés demeurent inconnues n'est présente que chez environ 4 % des êtres humains.

D'autre part l'action de ces enzymes vis à vis des autres esters de la choline est différente (83). La butyrylcholine qui est hydrolysée très lentement par l'acétylcholinestérase, l'est rapidement par la pseudocholinestérase. L'acétyl β -méthylcholine (isomère D) n'est hydrolysée que par l'enzyme des globules rouges. D'où la notion de substrats spécifiques qui a été soutenue de nombreuses années et récemment contestée par MENDEL et MYERS (78).

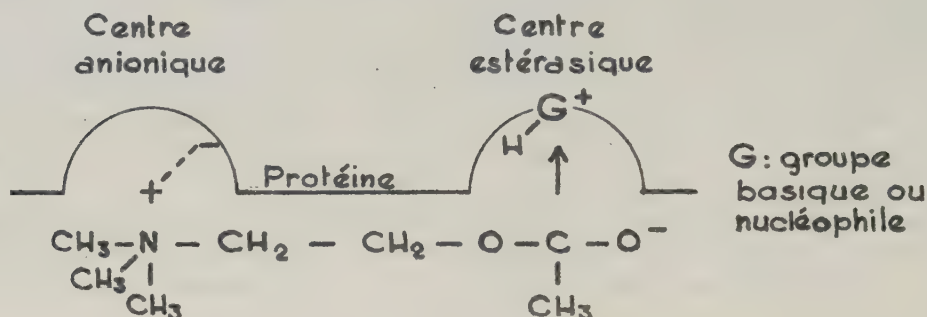
Nous allons maintenant étudier le mécanisme de la réaction enzyme-substrat, qui a été mis en évidence par NACHMANSON et WILSON en 1951 (86). Il y a tout d'abord combinaison entre l'enzyme et l'ester de la choline. Celle-ci est libérée dans un 2ème temps, tandis que le reste acide demeure fixé à l'enzyme. Celui-ci est régénéré par action de H_2O qui libère l'acide. Ces faits sont résumés par le schéma suivant :



EH : enzyme
AcCH : acétylcholine
ChOH : choline
AcOH : acide acétique

Les mêmes auteurs ont étudié le mécanisme de fixation du substrat sur l'enzyme au 1er temps de la réaction. Les cholinestérases comportent un site anionique consistant en un résidu acide glutamique et un site estérasique ou cationique constitué par la sérine. Ce site comporte un groupe basique ou nucléophile. Le site anionique par le jeu des forces de COULOMB attire les atomes chargés positivement de l'azote quaternaire de l'acétylcholine, ce qui fixe le substrat et l'oriente de façon à ce que le site estérasique puisse exercer son action hydrolytique par formation d'une liaison de covalence avec le carbone du carbonyle. Les forces de

VAN DER WAALS jouent également un rôle dans la constitution de ce système. D'où le schéma suivant : (20, 27)



Rôle physiologique des cholinestérases

Afin de mieux rendre compte de l'action des inhibiteurs que nous développerons plus loin, nous avons jugé utile de rappeler des notions fondamentales concernant le rôle physiologique des cholinestérases. Nous nous sommes largement inspirés de l'ouvrage de G. KOELLE "Cholinesterases and anticholinesterases agents". (65).

Seule l'acétylcholinestérase a une action physiologique importante. On ne connaît pas encore avec certitude le rôle de la pseudocholinestérase.

La cholinestérase se rencontre sur tout le trajet des nerfs cholinergiques : cylindraxe, dendrites, axones et leurs terminaisons. Elle se trouve à concentration beaucoup plus faible dans les nerfs non cholinergiques, par exemple les neurones sensoriels. Pour ces derniers, l'acétylcholine n'est pas le seul médiateur chimique et la transmission de l'influx nerveux est assurée aussi par d'autres substances.

Dans les nerfs cholinergiques, il existe une cholinestérase fonctionnelle directement utilisable et une cholinestérase de réserve.

Pour comprendre le rôle de cet enzyme, il est bon de rappeler le mécanisme d'action de l'acétylcholine au niveau de la jonction entre 2 nerfs. L'influx nerveux arrive par le nerf conducteur à l'axone terminal. Il présente un certain potentiel d'action qui provoque une libération d'acétylcholine. Celle-ci diffuse à travers l'espace synaptique, puis se combine avec une substance réceptrice hypothétique, ce qui produit une dépolarisation localisée, le potentiel post-synaptique. Celui-ci sert de potentiel d'action initial au 2ème neurone ou au muscle effecteur. D'autre part l'acétylcholine formée à la terminaison présynaptique provoque la libération d'une quantité supplémentaire d'acétylcholine, ce qui facilite la transmission de l'influx nerveux à travers la synapse.

Si l'acétylcholine n'était pas détruite, le passage de l'influx nerveux serait permanent, la libération d'acétylcholine s'activant elle-même. Aussi la fonction principale de la cholinestérase est de limiter l'action de transmission de l'acétylcholine à travers la synapse. Celle-ci est donc hydrolysée rapidement sous l'action de l'enzyme et donne une source de choline qui est reprise par les terminaisons présynaptiques où elle sert à la resynthèse de l'acétylcholine. D'autre part pendant la période de repos, la cholinestérase empêche l'accumulation de l'acétylcholine au niveau de la synapse.

Il en résulte que le rôle de la cholinestérase est extrêmement important. Il s'exerce dans la transmission de l'influx nerveux des fibres préganglionnaires aux ganglions autonomes, des nerfs cholinergiques postganglionnaires au muscle cardiaque et aux cellules sécrétoires, des nerfs moteurs aux muscles striés et probablement au niveau de certaines localisations du système nerveux central (111).

D'autre part on a pu se demander quelle est l'utilité de l'enzyme renfermé dans les érythrocytes. Sur des globules rouges mis en présence d'acétylcholine, on a observé un abaissement de perméabilité de leur membrane pour K^+ , Na^+ et l'hémoglobine. Cette action est constatée également en présence d'acide acétique. Aussi on a pensé que le système acétylcholine-cholinestérase de la membrane érythrocytaire régulariserait la perméabilité de celle-ci par mise en jeu du phénomène d'hydrolyse. Cependant le taux d'acétylcholine dans le sang est extrêmement faible. La cholinestérase sanguine jouerait aussi un rôle de régulation du taux d'acétylcholine dans le sang.

III - Les inhibiteurs des cholinestérases

Les inhibiteurs des cholinestérases sont des produits qui, en bloquant les sites actifs de l'enzyme, empêchent l'hydrolyse des esters de la choline. Ils se divisent en deux grands groupes : les inhibiteurs réversibles et les inhibiteurs irréversibles.

On parle d'inhibiteur réversible lorsque le complexe enzyme-inhibiteur se dissocie facilement, notamment par dialyse, montrant qu'il existe un équilibre entre l'inhibiteur libre et l'enzyme.

Avec les inhibiteurs irréversibles, un tel équilibre ne peut pas s'établir et l'activité de l'enzyme n'est pas régénérée par dialyse.

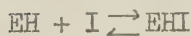
Cependant la distinction entre substrats d'action enzymatique et inhibiteurs, et entre inhibiteurs réversibles et irréversibles, n'est pas absolue et l'on connaît tous les intermédiaires. Par exemple sous certaines conditions on peut observer une hydrolyse de la butyrylcholine par l'acétylcholinestérase. Cependant l'hydrolyse de l'acétylcholine est empêchée par la butyrylcholine. Certains inhibiteurs sont hydrolysés par l'acétylcholinestérase et la substance obtenue après réaction est elle-même un inhibiteur.

Inhibiteurs réversibles

Ils se divisent eux-mêmes en deux groupes

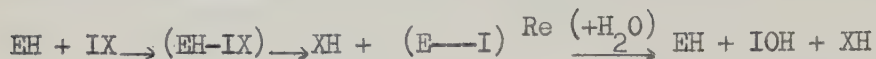
- 1) Les inhibiteurs compétitifs. Le substrat et l'inhibiteur influencent réciproquement leur activité vis à vis de l'enzyme et entrent en compétition pour un seul et même site actif de la molécule d'acétylcholinestérase, ce qui empêche leur fixation réciproque sur des sites séparés. La formation du complexe enzyme-substrat est gênée, mais son hydrolyse s'effectue normalement.
- 2) Les inhibiteurs non compétitifs. Substrat et inhibiteur se fixent sur des sites séparés de l'enzyme et n'ont pas d'interaction réciproque. La vitesse d'hydrolyse décroît car les molécules d'enzyme combinées avec l'inhibiteur ne sont plus capables d'assurer l'hydrolyse du substrat.

Dans le 1er cas, on a les deux réactions parallèles :
(EH : enzyme; S : substrat; I : inhibiteur)



Dans le 2ème cas, le complexe EHI se combine avec une molécule de substrat pour donner un complexe enzyme-inhibiteur-substrat qui n'est plus capable d'assurer l'hydrolyse de ce dernier.

Le mécanisme général d'action des inhibiteurs réversibles a été résumé par WILSON et BERGMAN en 1950 (109)



Dans un premier temps, il y a formation du complexe enzyme-inhibiteur. Puis le groupe labile X de l'inhibiteur est libéré et il subsiste un enzyme inhibé réactivable. $(E-I)_{Re}$. Si les conditions sont favorables, cette réactivation se fera par hydrolyse avec régénération de l'enzyme initial.

Les inhibiteurs réversibles sont tous des corps à fonction azotée. Les plus importants sont l'ésérine, la néostigmine, la physostigmine et les composés à fonction ammonium quaternaire. L'action de ces derniers s'explique d'ailleurs facilement : ils se fixent sur le site anionique de l'enzyme, ce qui empêche les esters de la choline de réagir. C'est en étudiant l'action inhibitrice de ces corps qu'on a émis l'hypothèse selon laquelle l'acétylcholinestérase renfermerait 2 sites anioniques. En effet les dérivés possédant 2 fonctions ammonium quaternaire sont des inhibiteurs plus puissants que ceux qui n'en ont qu'une seule. Cependant la présence des 2 sites anioniques n'est pas reconnue par tous les auteurs.

Les inhibiteurs réversibles ont été beaucoup étudiés, surtout in vitro. Ils ont permis de comprendre le mécanisme d'action des cholinestérases. In vivo leur rôle physiologique est peu important. Il n'en est pas de même des inhibiteurs irréversibles, essentiellement constitués par les composés organophosphorés. Aussi leur étude mérite-t-elle un développement particulier.

IV - Les composés organophosphorés

1 - Historique

Le premier composé organophosphoré, le tétraéthylpyrophosphate ou TEPP fut synthétisé en 1854 par DE CLERMONT au laboratoire de WÜRTZ (32). D'autres corps de la même famille furent découverts ensuite, mais on ne soupçonnait pas encore la toxicité de ces produits. Celle-ci fut mise en évidence par LANGE et KRÜGER (68) en 1932 lors de la découverte des organophosphorés fluorés. Quelques années auparavant, WISSING avait montré que le phosphate de tricrésyl avait une action insecticide sur la larve de Tenebrio Molitor. Tous ces travaux restèrent isolés et les composés organophosphorés ne présentaient alors qu'un intérêt purement académique.

Mais de 1934 à 1944, SCHRADER à la Farbenfabriken BAYER en Allemagne allait donner un essor considérable à la chimie de ces produits. Il en synthétisa environ 2000 et étudia leurs propriétés insecticides et leur pouvoir toxique. En 1937, il donna la formule générale d'un composé organophosphoré.

Le gouvernement allemand s'intéressa à ces recherches et environ 200 composés se révélèrent suffisamment toxiques pour être susceptibles d'être utilisés comme armes chimiques de guerre. Parmi ceux-ci figurent le Tabun. Ils furent dissimulés dans le groupe de détergents appelés Trilons.

Cependant l'Intelligence Service eut vent de ces travaux et des chimistes anglais synthétisèrent le Sarin et le Soman. Ils les désignèrent sous le nom de "nerves gases".

Le pouvoir anticholinestérasique de tous ces produits fut mis en évidence en 1940 par GREMELS.

Pendant la guerre, SCHRADER (97) continua néanmoins ses recherches en vue d'obtenir des insecticides et c'est en 1944 qu'il synthétisa le Parathion, corps dont l'importance allait se révéler considérable. Après la guerre, les travaux sur les composés organophosphorés furent repris par d'autres chercheurs. Ils essayèrent de synthétiser des produits qui tout en étant actifs sur les insectes, sont peu toxiques pour l'homme et les animaux à sang chaud.

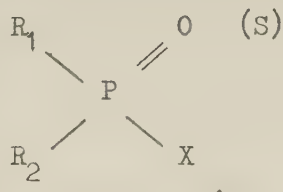
Le gros avantage des composés organophosphorés sur les insecticides connus auparavant est que ce sont, selon la terminologie anglosaxonne, des "systémiques". C'est à dire qu'ils pénètrent dans le système vasculaire des végétaux et y persistent un certain temps. Ils sont par ce fait susceptibles d'avoir une action prolongée sur les insectes. (34)

Plus récemment, vers 1954, la découverte par MAC GREGOR et ses collaborateurs (72) d'insecticides systémiques animaux devait permettre de lutter contre certaines maladies parasitaires, en particulier contre l'hypodermose bovine.

2) - Constitution chimique générale (40, 59, 65)

Un composé organophosphoré renferme

- un atome de P
- un atome d'O, ou de S
- 2 substituants organiques semblables ou différents R_1 et R_2
- un résidu d'acide organique ou inorganique X selon la formule générale.



R_1 et R_2 sont variables à l'infini : alcools, phénols, mercaptans, amides, groupes alkyl ou aryl.

X peut être F, Cl, le paranitrophénol, un phosphate ou pyrophosphate, un cyanure, sulfocyanure, émol, carboxylate ou divers groupes phénoxy ou thiophénoxy.

3) - Classification et principaux organophosphorés.

Leurs formules et dénominations chimiques seront énoncées dans le tableau ci-contre :

a) X : halogène, R_1 : alcooxy, R_2 : alkyl

Ce groupe renferme les dérivés fluorés dont les plus importants sont le Sarin et le Soman. Tous ces corps sont très toxiques.

b) X : halogène, CN, SCN, R_1 et R_2 : alcooxy.

Ce groupe renferme aussi des dérivés fluorés dont le DFP, très toxique. Les dérivés CN et SCN ont une toxicité plus faible.

c) X : halogène, CN, SCN, R_1 : alkylamido, R_2 : alcooxy.

Egalement dérivés fluorés et dérivés CN dont le Tabun.

d) composés alcooxydialkyl, ou dialcooxyalkyl

Corps de formules très variées et dont la toxicité diffère beaucoup d'une molécule à l'autre. Les principaux sont le Dipterex ou Trichlorfon, le

FORMULES DEVELOPPEES DES COMPOSES ORGANOPHOSPHORES CITES

FORMULE DEVELOPEE	DENOMINATION CHIMIQUE	DL 50 souris 0,7 mg/l i.p.
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})-\text{O}-\text{P}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	Tétraéthylpyrophosphate TEPP	
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{O}-\text{P}(=\text{O}) \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Méthylfluorophosphinate d'isopropyle Sarin	0,05 mg s.c.
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}-\text{O}-\text{P}(=\text{O}) \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Méthylfluorophosphinate de pinacolyle Soman	0,05 mg s.c.
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{O}-\text{P}(=\text{O}) \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	" Diisopropyle Fluorophosphonate" DFP	4 mg/Kg i.p.
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}_3-\text{N}-\text{P}(=\text{O}) \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Diméthylaminocyanophosphinate d'éthyle Tabun	0,6 mg/l i.p.
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2 \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2 \end{array}$	Phosphate de diéthyle et de paranitrophényle Paraoxon éthyle. E 600	0,7 mg s.c.
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{S})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2 \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2 \end{array}$	Thiophosphate de diéthyle et de paranitrophényle Parathion éthyle. E 605. Phosphémol	7 mg/Kg s.c.
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{S})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	Thiophosphate de diéthyle et d'éthylthioglycol Déméton. Systox	30 mg/l per c
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{C}=\text{N} \\ \diagup \\ \text{CH} \end{array}$	Thiophosphate de diéthyle et de méthyl 4 isopropyl 2 pyrimidyle 6 Diazinon	65 mg/l i.p.

$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{-O}-\text{P}=\text{S} \\ \\ \text{H}_3\text{-O}-\text{P}-\text{S}-\text{CH}-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	Thiophosphate de diméthyle et de mercaptosuccinate d'éthyle Malathion	750 mg/Kg i.p
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{-O}-\text{P}=\text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{-O}-\text{P}-\text{CHOH}-\text{C}(\text{Cl})_3 \end{array}$	Trichloro 2,2,2 hydroxy 1 éthyle phosphonate de diméthyle Bayer L 13/59. Dipterex. Trichlorfon Varopal. Néguvon	500 mg/Kg i.p
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{-O}-\text{P}=\text{S} \\ \\ \text{H}_3\text{-O}-\text{P}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{Cl})_3 \end{array}$	Thiophosphate de diméthyle et de trichloro 2,4,5 phényle Dow ET 57. Etrolène. Ronnel. Fenchlorphos	1740 mg/Kg per os
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{-O}-\text{P}=\text{S} \\ \\ \text{H}_3\text{-O}-\text{P}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_3 \end{array}$	Thiophosphate de diméthyle et de mercapto méthylcarbamate de N méthyle Diméthoate. Rogor	140 mg/Kg per os
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{-O}-\text{P}=\text{S} \\ \\ \text{H}_3\text{-O}-\text{P}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_3 \end{array}$	N méthyl 0,0 diméthyl dithiophosphoryl 5 thio 3 diméthyl 2,2 valéramide 13 072 R.P. Sisvar	350 mg/Kg per os
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{-CH}_2-\text{O}-\text{P}=\text{O} \\ \\ \text{CH}_3-\text{P}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{I}^- \end{array}$	Iodure de thiocholine méthylphosphonate d'éthyle	0,03 mg/Kg i.p

Par DL 50 souris, nous exprimons la dose létale 50 des différents organophosphorés pour la souris.

Voies : s.c. : sous-cutanée
i.p : intrapéritonéale

Paraoxon méthyl et éthyl.

e) composés thiol

Corps très toxiques, inhibiteurs directs des cholinestérases.

f) thionophosphates

A la différence des précédents, ces corps ne sont pas des inhibiteurs directs des cholinestérases, mais dans l'organisme, ils peuvent être transformés en des produits qui sont de puissants inhibiteurs (57). Ce groupe comprend le Parathion méthyl et éthyl, le Déméton ou Systox et ses dérivés, le Diazinon, le Ronnel ou Etrolène.

g) Thiolthionophosphates

Ces corps se comportent comme les précédents, mais sont moins toxiques. Ce groupe renferme le Malathion et le Rogor ou Diméthoate.

h) Dérivés de l'acide pyrophosphorique et composés similaires.

Ce sont les composés les plus anciennement connus. Ils comprennent entre autres le TEPP.

i) Composés renfermant un groupe ammonium quaternaire.

Ces corps ont des propriétés spéciales, les unes résultant du phosphate organique et les autres de la base ammonium quaternaire. Ce sont des inhibiteurs très puissants des cholinestérases.

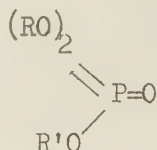
4) - Propriétés physicochimiques générales (25)

La grande variété des composés organophosphorés entraîne des différences importantes entre leurs propriétés physicochimiques. Les uns sont des gaz (Sarin, Tabun), d'autres sont des liquides de consistance huileuse (Parathion). D'autres enfin sont solides (Trichlorfon, Diméthoate). La plupart des organophosphorés ont une tension de vapeur élevée, et possèdent de ce fait une toxicité par voie respiratoire. Les produits liquides sont très peu solubles dans l'eau, mais miscibles avec les huiles et la plupart des solvants organiques.

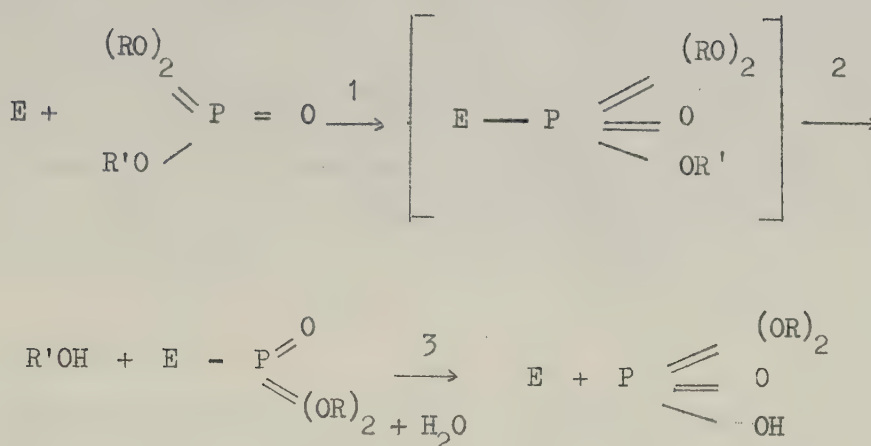
La stabilité des organophosphorés est très variable. Certains comme le TEPP s'hydrolysent très rapidement, ce qui les rend impropres à l'usage insecticide. D'autres sont beaucoup plus stables. Mais tous les composés sont rapidement hydrolysés en milieu alcalin.

5) - Mode d'action des organophosphorés sur les cholinestérases.

Les composés organophosphorés sont de puissants inhibiteurs des cholinestérases, et agissent de manière irréversible. Le mécanisme d'action de ces produits a fait l'objet de nombreuses études : WILSON et BERGMAN (109) ont montré que le processus d'inhibition consistait en une phosphorylation de l'enzyme par le composé organophosphoré, précédée par une fixation initiale de l'inhibiteur à l'enzyme. Plus le pouvoir de phosphorylation est élevé, plus l'inhibition est grande. Ce processus serait comparable au phénomène d'acétylation de l'enzyme par l'acétylcholine. Pour un organophosphoré de formule :

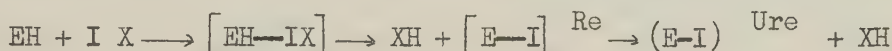


ALDRIDGE (4,6) propose le schéma suivant



Dans un premier temps se forme le complexe enzyme-inhibiteur. Puis le groupe labile R' de celui-ci est éliminé et il subsiste un enzyme phosphorylé. Le 3ème temps, s'il se produit, est en tout cas très lent et aboutirait à la régénération de l'enzyme.

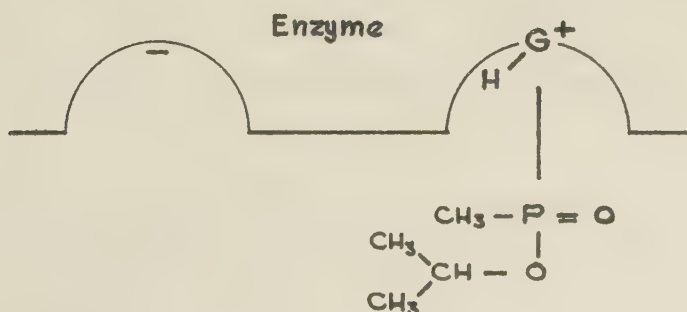
Ce mécanisme diffère quelque peu de celui proposé par WILSON et BERGMANN (109)



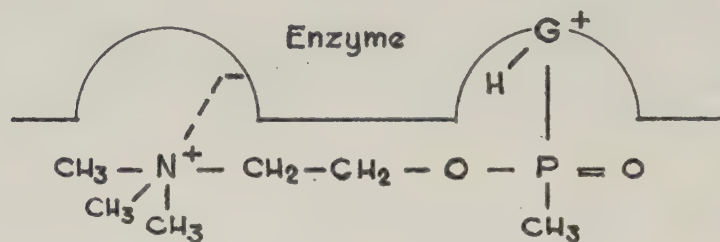
où l'enzyme phosphorylé réactivable $(\text{E} - \text{I})^{\text{Re}}$ se transforme en un complexe non réactivable $(\text{E} - \text{I})^{\text{Ure}}$ (unreactivable), ce qui exprime bien la propriété d'inhibiteurs irréversibles des organophosphorés. La vitesse de transformation dépend de la nature de l'organophosphoré.

Mais comment se produit cette phosphorylation ? (59) La molécule de cholinestérase renferme un site anionique et un site estérasique.

A la différence de l'acétylcholine, les organophosphorés n'ont pas de charge positive et ne peuvent donc pas se fixer sur le site anionique. Par contre on a montré que l'atome de P des organophosphorés se fixe sur le groupe basique du site estérasique, comme le groupement acétyle de l'acétylcholine, selon le schéma suivant :



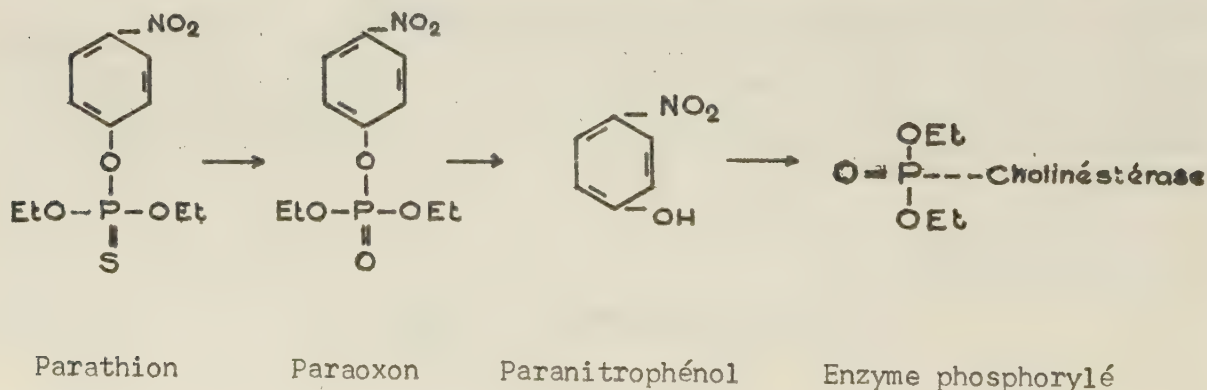
Les organophosphorés à fonction ammonium quaternaire se fixent en plus sur le site anionique par leur azote chargé positivement.



Il reste à expliquer comment le complexe réactivable se transforme en un enzyme inhibé de façon irréversible. HOBIGER (55) a montré que l'organophosphoré se fixait d'abord sur l'azote du cycle imidazole de l'histidine. Puis il se produit un phénomène de transphosphorylation et dans la forme non réactivable, l'atome de P est fixé sur le groupe hydroxyle de la sérine, et cette dernière liaison est d'une grande stabilité. Ce processus se déroule *in vivo* chez l'homme et les animaux.

6) - Destinée des organophosphorés dans l'organisme.

Les recherches effectuées à ce sujet ont surtout été réalisées à propos du Parathion, qui a été l'organophosphoré le plus étudié. Il peut pénétrer dans l'organisme par voie digestive, respiratoire ou cutanée. Ce dernier mode de pénétration a été étudié par FREDERIKSSON et ses collaborateurs (44) qui ont montré que le Parathion ne subissait aucune transformation dans le tissu cutané. Il pénètre à travers la peau grâce à sa solubilité dans les lipides. Puis il arrive dans la circulation et dans le foie, il subit une transformation en Paraaxon.



DAVISON (30) qui a étudié ce mécanisme a montré qu'il s'agit d'une réaction enzymatique, que la présence de DPN et d'ions Mg⁺⁺ est nécessaire à la réaction, et que le système enzymatique est localisé dans les microsomes et le surnageant clair après centrifugation différentielle. Cette transformation est importante, car elle explique la grande toxicité du Parathion, bien qu'*in vitro* il soit un faible inhibiteur des cholinestérases. Le Paraaxon par contre a une action inhibitrice très forte. Il va phosphoryler l'enzyme et libérer du paranitrophénol.

qui est éliminé par voie urinaire (5).

D'autre part une partie du Parathion est hydrolysée dans l'organisme sous l'action des phosphorylphosphatases. Il se produit du phosphate d'éthyle et également du paranitrophénol.

Cependant les organophosphorés ont la propriété d'inhiber les systèmes enzymatiques qui seraient capables de leur enlever leur toxicité.

D'autres composés subissent des réactions analogues. Mais certains sont anticholinestérasiques d'emblée. La nature du produit éliminé varie avec l'organophosphoré. Dans le cas du paranitrophénol, sa détection dans l'urine est possible par réduction, diazotation et copulation. Cette méthode peut servir pour réaliser un dosage colorimétrique (3).

7) - Action sur les insectes

Pour l'étude de l'action toxique des composés organophosphorés sur les insectes, nous nous bornerons à quelques notions générales, ce sujet étant très amplement traité par O'BRIEN. (87)

Chez les insectes, les cholinestérases sont contenues uniquement dans le système nerveux. Elles sont considérées comme vitales pour les fonctions nerveuses, probablement par élimination de l'acétylcholine qui est considérée comme le médiateur chimique normal. Mais si elle s'accumule, elle bloque la transmission de l'influx, ce qui peut entraîner la mort.

Comme chez les vertébrés, les composés organophosphorés ainsi que tous les agents anticholinestérasiques inhibent les enzymes responsables de la destruction rapide de l'acétylcholine libérée durant l'activité nerveuse normale.

Si l'insecte survit, ses cholinestérases se régénèrent assez rapidement, par un mécanisme d'ailleurs inconnu.

Généralement la toxicité d'un composé organophosphoré est en rapport avec son pouvoir inhibiteur. Mais des observations ont montré que cette règle n'était pas toujours absolue.

DEUXIEME CHAPITRE

TOXICOLOGIE DES COMPOSES ORGANOPHOSPHORES

I. - Toxicité des organophosphorés et symptômes d'intoxication

Les doses toxiques des composés organophosphorés varient d'un corps à l'autre. L'ouvrage de G. KOELLE "Cholinesterases and anticholinesterases agents" indique la DL 50 pour rats et souris de nombreux corps de ce groupe. Etant de 0,03 mg/Kg pour les dérivés les plus toxiques, elle peut s'abaisser jusqu'à 3000 mg/Kg. Pour la très grande majorité des composés, elle n'est que de quelques mg/Kg. Il s'agit donc de corps très toxiques.

Chez l'homme, les symptômes de l'empoisonnement par les organophosphorés ont été observés et décrits en détail par HOLMSTEDT (59), et par DURHAM et HAYES (35). En effet aux Etats-Unis, le Parathion et des produits similaires ont été utilisés sur une grande échelle comme insecticides. Les précautions pour leur manipulation, dont nous parlerons plus loin, n'ont pas toujours été prises et de nombreux cas d'empoisonnement, dont certains mortels, se sont produits. Il est intéressant d'en décrire les symptômes.

Plusieurs voies de pénétration sont possibles. L'ingestion du toxique peut être réalisée si des aliments sont rentrés accidentellement en contact avec les insecticides, ou si les traitements sont pratiqués immédiatement avant la récolte. L'intoxication respiratoire est plus fréquente à cause de la forte tension de vapeur des organophosphorés et de l'absorption des brouillards résultant de leur pulvérisation. Enfin la pénétration cutanée joue un rôle non négligeable au cours des manipulations des produits : mains, vêtements. Elle peut se faire par toute la surface du corps.

Une intoxication légère se traduit tout d'abord par le myosis, avec sensation de lourdeur et de pression oculaire, difficulté d'accommodation et parfois obscurcissement de la vision. En même temps peuvent se produire des nausées et des vomissements. Sur le système respiratoire, on remarque une augmentation des sécrétions salivaires, nasales et bronchiques, une sensation de lourdeur dans la tête et une respiration haletante provoquée par la bronchoconstriction.

A dose 6 fois plus forte que celle provoquant les symptômes précédents, on obtient des effets systémiques, apparaissant de quelques minutes à 1/2 heure après l'exposition au toxique. A dose 20 fois plus forte, l'intoxication est déjà sérieuse et les symptômes alarmants. Les effets systémiques sont de deux sortes :

1) - effets muscariniques. Ils sont dus à l'accumulation de l'acétylcholine (67) et ne sont que l'aggravation des symptômes locaux mentionnés plus haut. Les sécrétions sont exagérées. La respiration devient difficile et sifflante. A un stade plus aigu, les mouvements respiratoires deviennent si pénibles que le sujet est pris de panique et perd finalement conscience. D'autres manifestations muscarini-

ques apparaissent : anorexie, nausées, lourdeurs épigastriques et substernales, crampes abdominales, augmentation du péristaltisme intestinal, diarrhée et même défécation involontaire. On observe également de la pâleur, une sudation exagérée, un larmoiement, des mictions fréquentes et une légère bradycardie.

2) - Effets nicotiniques. Ils se manifestent par des crampes, des fasciculations et des contractures des muscles, avec augmentation de leur fatigabilité. Ils peuvent se généraliser à tout l'appareil musculaire, d'où extrême faiblesse générale. Même les muscles respiratoires sont atteints et l'on observe une respiration intermittente avec cyanose. Une exagération de ces effets peut provoquer la mort par arrêt respiratoire. Si l'intoxication est moins grave, on observe de l'hypertension.

Le système nerveux central est également touché. L'intoxiqué manifeste de l'anxiété, des insomnies avec cauchemars, des vertiges. Apparaissent également : difficulté de concentration, perte de mémoire, apathie, dépression nerveuse. On a remarqué des anomalies de l'encéphalogramme. Si l'intoxication est plus sévère, on observe de l'ataxie, des troubles de la parole avec bégaiement, puis des convulsions et le coma.

A long terme, mais seulement avec certains composés organophosphorés, on a constaté chez des travailleurs une paralysie des mains et des jambes persistant plusieurs mois. Ce phénomène serait dû à une démyélination de la gaine des nerfs (28).

Si l'intoxication est mortelle (57), ceci peut être dû à la paralysie des centres respiratoires et circulatoires, à l'extrême faiblesse des muscles respiratoires, ou à la bradycardie avec fibrillation ventriculaire. On observe le plus souvent un arrêt respiratoire avec acidose due au manque d'oxygène des tissus par suite du ralentissement de la circulation et des besoins accrus en oxygène résultant de la stimulation cholinergique.

La description précédente est celle de l'intoxication aiguë. Mais on peut se demander s'il n'existerait pas une intoxication chronique.

Si les organophosphorés de type Parathion sont éliminés assez rapidement, les cholinestérases inhibées sont longues à réapparaître, d'où prolongation des effets dus à l'accumulation de l'acétylcholine. Cependant l'intoxication chronique peut être réalisée par un autre mécanisme, signalé par le Professeur CHAMBON (18). Des travailleurs manipulent des produits genre Parathion pendant un certain temps sans ressentir le moindre symptôme, jusqu'au jour où ils manifestent les signes d'une intoxication aiguë, pour une dose inactive sur un individu normal. Deux explications sont possibles :

- à chaque pénétration du toxique, il y a bien élimination de celui-ci, mais peu à peu les cholinestérases du sujet sont inhibées et arrivent à descendre à un seuil suffisamment bas pour qu'il y ait intoxication.

- L'intoxication cumulative est due à l'organophosphoré lui-même qui subsiste dans l'organisme grâce à sa solubilité dans les lipides.

Ces phénomènes d'intoxication chronique posent des problèmes de prophylaxie dont nous parlerons plus loin.

II.- Réactivation des cholinestérases après inhibition par les organophosphorés.

1) Réactivation spontanée

Après la cessation de l'exposition au toxique, on a constaté la disparition des symptômes d'intoxication, alors que le taux des cholinestérases globulaires et plasmatiques reste très bas. Aussi on a pensé que l'enzyme tissulaire se régénérerait

plus rapidement que les cholinestérases sanguines. En fait la vitesse de régénération tissulaire est encore inconnue.

Dans le sang, la pseudo cholinestérase du plasma met 30 à 40 jours pour revenir au taux normal avant exposition au toxique. La régénération de l'enzyme globulaire est encore plus lente et nécessite 80 à 100 jours après complète inhibition. On a évalué la vitesse de régénération à environ 1% par jour et elle serait due uniquement à la resynthèse de l'enzyme. Des auteurs ont pensé à une réactivation très lente de l'enzyme inhibé. (31). En fait on n'a pas pu mettre en évidence ce phénomène. Il y a bien une transformation lente du complexe phosphorylé, mais qui n'aboutit pas à la régénération des produits initiaux. La réaction d'inhibition est donc bien irréversible.

2) Réactivation au moyen d'agents chimiques.

Depuis la connaissance des effets inhibiteurs des organophosphorés sur les cholinestérases, on a cherché des produits qui seraient susceptibles de détruire le complexe enzyme phosphorylé et de régénérer la cholinestérase initiale. Les travaux de CHILDS, DAVIES et leurs collaborateurs (24) ont mis en évidence le pouvoir réactivateur de l'hydroxylamine et des acides hydroxamiques, ainsi que de divers corps renfermant une fonction oxime. Ils ont étudié toute une série de produits, entre autres la mono-et la diisonitroso-acétone (MINA et DINA), la diacétylmonoxime (DAM) et surtout le pyridine 2 aldoxime méthyliodure (P_2AM) qui devait se révéler le meilleur réactivateur. (35)

Le seul composé utilisé en France est le Contrathion ou méthylsulfate de méthyl 1 N hydroxyiminométhyl 2 pyridinium. Il est commercialisé par la firme Spécia.

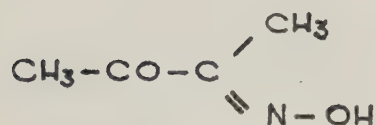
Nous allons indiquer ici les formules développées des principaux réactivateurs des cholinestérases.



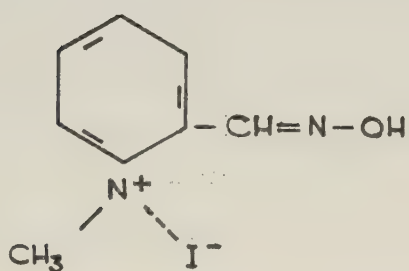
Monoisnitrosoacétone MINA



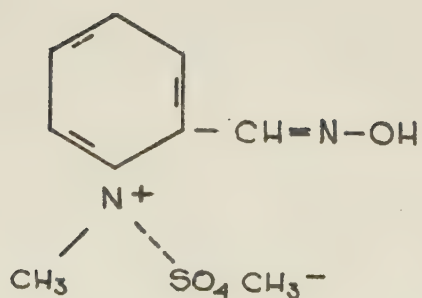
Diisonitrosoacétone DINA



Diacétylmonoxime DAM



Pyridine 2 aldoxime méthyliodure
P₂ AM



Méthylsulfate de méthyl 1
hydroxyimino méthyl 2 pyridinium
Contrathion 7676 R.P

Mais quel est le mécanisme d'action de ces corps? Il a été montré que des produits tels qu'acides ou esters qui sont capables de réaliser une attaque nucléophile sur l'atome de P du complexe inhibiteur enzyme, peuvent régénérer ce dernier.

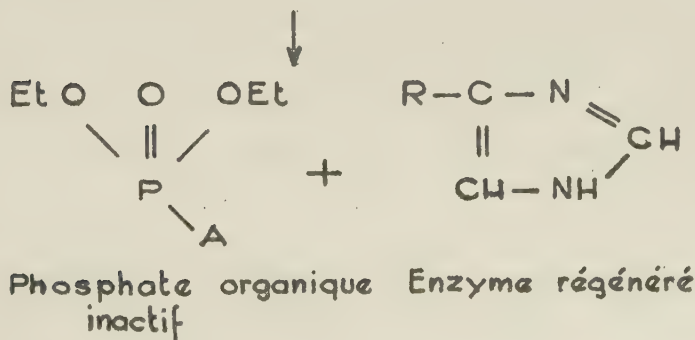
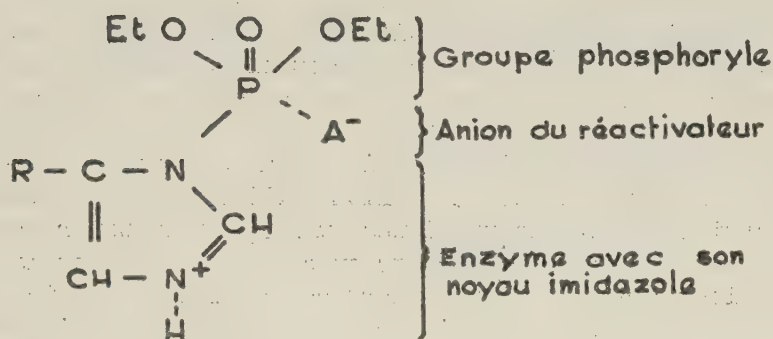
Selon cette théorie, la présence dans un réactivateur d'une structure cationique, tel qu'un radical ammonium, faciliterait la réaction, car il y aurait fixation possible de la substance sur le site anionique de l'enzyme, comme pour l'acétylcholine. Les acides hydroxamiques et les oximes remplissent les conditions imposées par la théorie, parce qu'ils ont en même temps des groupes nucléophiles et ammonium cationiques dans leur molécule.

D'après DAVIES (28,29) le mécanisme d'action d'un réactivateur R peut se résumer par le schéma suivant :



(EI : Enzyme inhibé)

Le complexe EIR n'a qu'une existence transitoire. Mais ce phénomène ne peut se dérouler que sur l'enzyme phosphorylé réactivable, c'est-à-dire où l'atome de P est fixé sur le noyau imidazole de l'histidine. La liaison P-hydroxyle de la sérine est beaucoup plus stable et ne peut pas être rompue par les réactivateurs.



HOLMSTEDT (59) propose un schéma plus complet des réactions possibles des réactivateurs.

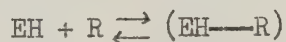
a) avec l'inhibiteur

X étant le groupe labile de l'inhibiteur IX et R le réactivateur.



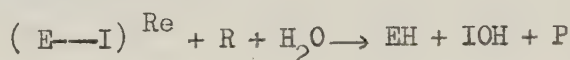
IOH est un produit atoxique, P représente les produits de réaction du réactivateur. Il a donc pour rôle de réagir avec l'organophosphoré et de lui enlever sa toxicité.

b) avec l'enzyme



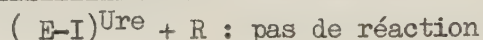
L'enzyme peut s'unir au réactivateur, ce qui le protège contre l'action des inhibiteurs. Cependant l'affinité du réactivateur est plus grande pour l'inhibiteur que pour l'enzyme.

c) avec l'enzyme inhibé réactivable



Cette réaction aboutit à la régénération de l'enzyme.

d) avec l'enzyme inhibé non réactivable (unreactivable)



Dans ce cas, le réactivateur est inactif.

Il résulte de ce mode d'action que le réactivateur présente son maximum d'activité s'il est administré tout de suite après l'inhibiteur, par exemple dans la $\frac{1}{2}$ heure qui suit. Par contre au bout d'un certain temps, lorsque le complexe enzyme-inhibiteur aura évolué vers la forme non réactivable, son action sera nulle.

Mais l'on peut se demander si les réactivateurs ne sont pas eux-mêmes toxiques pour l'organisme. C'est dans ce but que CELICE, FOURNEL et ses collaborateurs (14) ont étudié les propriétés pharmacodynamiques du P₂AM et du Contrathion.

Ils ont opéré sur des chiens, des chats ou des lapins et ont montré que le P₂AM et le Contrathion n'ont d'activité pharmacodynamique significative que s'ils sont administrés à doses élevées, de l'ordre de 25 mg/Kg par voie intraveineuse. Mais ce sont justement ces doses qui sont actives dans les cas d'intoxication aiguë grave par des composés anticholinestérasiques.

Les effets obtenus sont les suivants :

- a) augmentation de la pression artérielle
- b) bradycardie passagère, puis augmentation prolongée de l'amplitude de la contraction cardiaque.
- c) vasoconstriction
- d) aucune action ni sur le système respiratoire, ni sur le système neurovégétatif.
- e) action curarisante faible, mais réelle sur le système neuromusculaire. Ce qui confirme les observations d'HOLMES et ROBINS (58). Ces auteurs ont montré que les oximes ont la propriété de rétablir la liaison nerf-muscle qui était bloquée par les composés anticholinestérasiques, mais qu'à trop forte dose, ces réactivateurs causent eux-mêmes un blocage neuromusculaire.
- f) légère augmentation de la diurèse

La DL 50 du Contrathion a été déterminée sur souris et lapin par diverses voies

et est exprimée en mg/Kg d'hydrate de pyridine 2 aldoxime .

DL 50 Contrathion : souris et lapin, voie I.V.	100 mg/Kg
souris	voie S.C. 400 mg/Kg
souris	voie orale 1 g/Kg

Chez les animaux ayant reçu le produit en injections I.V. ou S.C. la mort survient par arrêt respiratoire précédant de peu l'arrêt cardiaque.

Chez l'homme, aux doses habituellement utilisées et que nous indiquerons plus loin, il n'a pas été observé d'accidents. Certains sujets se sont plaints de douleurs au point d'injection, ainsi que de sensations passagères de malaise si l'injection est trop rapide.

Mais si les doses administrées sont trop élevées, les réactivateurs peuvent avoir un pouvoir inhibiteur sur les cholinestérases et causer un blocage neuro-musculaire. Il en résulte que l'emploi des oximes de type p₂AM ou Contrathion doit être rigoureusement contrôlé.

III.- Traitement des intoxications par les composés organophosphorés.

Nous envisagerons successivement :

- le traitement des intoxications graves
 - a) par l'atropine
 - b) par la contrathion
 - c) par l'association atropine-contrathion
 - d) traitement préventif
- le traitement des intoxications légères

1) Traitement des intoxications graves

a) par l'atropine (35, 56)

L'intoxication par les composés organophosphorés résultant d'une accumulation d'acétylcholine, et celle-ci étant un parasympatomimétique, on a pensé combattre ses effets en administrant un parasympatolytique : l'atropine.

C'est le mode de traitement le plus anciennement connu et le seul utilisé pendant de nombreuses années.

Un organisme intoxiqué par les organophosphorés supporte des quantités beaucoup plus élevées d'atropine qu'un individu normal. Sa durée d'action est courte et il est nécessaire de répéter les doses. Aussi on administrait 2 à 4 mg par voie intraveineuse, puis 2 mg toutes les 10 minutes jusqu'à apparition des signes de surdosage en atropine : sécheresse des muqueuses, tachycardie. Dans tous les cas l'atropinisation doit être maintenue 24 heures et dans les intoxications les plus graves 48 heures.

L'administration d'atropine facilite la respiration en faisant régresser la bronchoconstriction, ainsi que la sécrétion salivaire et bronchique. En même temps il y a accélération cardiaque, diminution de l'activité toxique sur le centre respiratoire, cessation des convulsions et retour à la normale des fonctions des systèmes nerveux central et autonome. Afin d'assurer une ventilation pulmonaire suffisante, il est nécessaire d'éliminer les sécrétions accumulées dans les bronches.

L'atropine n'a malheureusement aucun effet sur les manifestations nicotiniques dues aux organophosphorés. Aussi il est nécessaire de lui associer des neuroplégiques tels que Parsidol (43), Parpanit ou Diparcol.

b) par le Contrathion

L'intoxication par les composés organophosphorés se traduit par une inhibition des cholinestérases. Aussi l'on a pensé administrer des composés chimiques dont le rôle est de détruire le complexe enzyme-inhibiteur en régénérant les cholinestérases initiales.

Le seul réactivateur utilisé en France est le Contrathion, produit voisin du P_2AM , dont la composition chimique a été donnée page 23.

C'est une poudre cristalline blanche très sensible à la lumière et très soluble dans l'eau. Il est présenté sous forme lyophilisée. Sa solution dans l'eau physiologique doit être préparée au moment de l'emploi (200 mg pour 10 ml). Elle peut être administrée :

- en cas d'urgence par voie intraveineuse, soit directement sans dilution et en injection lente, soit en perfusion après dilution de la solution dans du soluté chloruré ou glucosé isotonique.

- par voie sous-cutanée ou intramusculaire.

- par voie buccale si l'intoxication est légère.

Le Contrathion est intéressant à utiliser dans les intoxications aiguës. Il résulte des travaux expérimentaux (56) qu'il doit être administré le plus rapidement possible.

Ce produit s'éliminant très vite, il est préférable de l'utiliser en perfusion intraveineuse lente, à doses assez élevées : 2 à 3 g pour une période de 12 heures. Ce qui se justifie par l'extrême difficulté qu'a le Contrathion pour passer la barrière méningée en vue de la régénération de la cholinestérase du cerveau, et par la nécessité de saturer tous les tissus en réactivateur.

Dans les intoxications chroniques, l'administration de Contrathion ne présente qu'un intérêt limité, les cholinestérases inhibées ne pouvant plus être régénérées.

c) Par l'association atropine-Contrathion

On a remarqué que l'atropine potentialise l'action du Contrathion. C'est pourquoi la meilleure thérapeutique et la seule actuellement utilisée consiste à associer atropine et Contrathion. Elle permet d'employer des doses plus faibles de chacun des produits.

On administre d'abord 0,5 mg de sulfate d'atropine par voie intraveineuse et aussitôt après on pratique une injection intraveineuse lente (1 ml par mn) de 400 mg de Contrathion. Ces doses sont répétées une demi-heure plus tard, et ensuite aussi souvent que le nécessite l'état du sujet.

En cas de tremblements fibrillaires, associer au traitement précédent les injections intramusculaires ou intraveineuses lentes de diéthazine ou Diparcol, à raison de 250 mg. dans 10 ml d'eau physiologique.

Si l'intoxication est très grave, on associe aux injections répétées de sulfate d'atropine (jusqu'à apparition d'une légère mydriase), la perfusion intraveineuse lente de Contrathion dans du sérum glucosé, à la dose de 1,5 à 2 g par 24 heures, fractionnée en plusieurs fois.

La conduite de ce traitement doit bien évidemment être effectuée sous surveillance médicale. En effet ces antidotes sont des produits eux-mêmes toxiques.

D'autre part il est essentiel de maintenir la ventilation pulmonaire du sujet. Si c'est nécessaire, la trachéotomie doit être pratiquée afin d'éliminer l'excès de sécrétions bronchiques.

Il est parfois utile de combattre l'hypotension par injection de camphre soluble.

La morphine est formellement contre indiquée.

d) Traitement préventif

Bien que l'on possède des antidotes physiologiquement actifs, on ne doit pas négliger l'aspect préventif du traitement, qui permet parfois de limiter l'importance de l'intoxication.

Il faut éloigner le sujet du contact avec le toxique, lui enlever ses vêtements s'ils sont imprégnés d'organophosphorés en prenant soi-même des précautions (les mains protégées par des gants de caoutchouc), le laver largement au savon de Marseille ou avec une solution bicarbonatée à 5%. Ne pas employer de corps gras qui faciliteraient la pénétration du toxique. Si ce dernier a été absorbé par voie buccale, pratiquer un lavage d'estomac avec de l'eau bicarbonatée contenant du charbon animal en suspension.

2) Traitement des intoxications légères

Il peut présenter un intérêt pour les utilisateurs des composés organophosphorés employés dans la lutte contre le varron, ces produits étant beaucoup moins toxiques que ceux utilisés comme insecticides sur les végétaux.

Effectuer des lavages des téguments, indispensables si le sujet a été en contact avec le produit et en état de transpiration. Pratiquer s'il y a lieu un lavage d'estomac.

Administrer par voie buccale un granule de 0,5 mg de sulfate d'atropine toutes les heures en surveillant les réactions pupillaire et cardiaque.

Pratiquer une injection intraveineuse lente ou intramusculaire d'une dose de 200 mg de Contrathion, ou faire absorber par voie buccale 400 mg de Contrathion dans un peu d'eau.

Imposer le repos complet, interdire les mouvements et la marche pendant toute la durée du traitement.

IV.- Prophylaxie

L'usage des composés organophosphorés doit être fait en prenant les précautions suivantes inspirées par la pratique de leur utilisation dans le domaine agricole. Elles sont aussi valables pour leur emploi particulier dans le traitement contre le varron.

a) au cours de la détention

Conserver les produits et leurs solutions concentrées dans leurs emballages d'origine et dans des locaux fermés à clé, à l'écart de tout aliment.

b) au cours de l'emploi

Les manipulateurs doivent porter des vêtements de travail et des gants imperméables pour éviter le contact du produit avec la peau.

Ne pas manger, ni boire au cours du traitement.

c) après l'emploi

Vider et nettoyer la verrerie et les récipients sur les lieux même du travail. Détruire et enterrer les emballages vides après les avoir décontaminés par lavage avec une solution alcaline.

Des mesures analogues doivent être appliquées aux ouvriers d'usine qui manipulent ces produits. Mais dans ce cas une autre mesure s'impose, car toutes les précautions précédentes n'empêchent pas toujours les risques d'intoxication. C'est le dosage des cholinestérases dans le sang à intervalles réguliers.

Bien qu'il n'y ait pas toujours relation entre le taux des cholinestérases du sang et les symptômes d'intoxication, il est normal de considérer qu'un sujet dont

Le taux de cholinestérase est abaissé est beaucoup plus vulnérable à l'action des organophosphorés. Selon GAGE (45), il faut éloigner du contact avec le toxique les sujets dont la cholinestérase est abaissée de 50% par rapport aux valeurs normales. Celles-ci ont été déterminées en prenant la moyenne du taux de nombreux individus normaux. Un taux d'abaissement de 40% doit déjà entraîner des mesures de protection, et de 30 à 40% doit faire renforcer les contrôles du taux de cholinestérase.

Le dosage des cholinestérases sanguines chez l'homme est certainement le moyen le plus sûr de dépistage possible du début d'une intoxication qu'il est alors possible de limiter et de traiter efficacement.

C'est cet aspect biologique de l'intoxication que nous allons examiner.

TROISIEME CHAPITRE

LE DOSAGE DES CHOLINESTERASES DANS LE SANG

I.- Introduction et principe général

Le principe général du dosage des enzymes est le suivant : il consiste à effectuer la détermination soit des produits résultant de leur action sur un substrat aussi spécifique que possible, soit du substrat persistant après un temps de réaction enzymatique exactement déterminé (méthode par différence).

Le dosage des cholinestérases repose sur ce principe général. Le substrat est constitué par un ester de la choline à concentration connue et optimale. Celui-ci est hydrolysé au cours de la réaction enzymatique en choline et acide organique, ce dernier étant le plus fréquemment titré. La vitesse de réaction est proportionnelle à la quantité de cholinestérase présente dans l'échantillon à tester et permet donc de déterminer celle-ci.

On peut envisager d'une part les problèmes posés par le dosage de l'enzyme lui-même : cholinestérase vraie dans les globules rouges et pseudocholinestérase dans le plasma.

D'autre part on peut aussi envisager la spécificité du substrat utilisé : acétyl β - méthylcholine pour la cholinestérase vraie, butyrylcholine dans le cas de la pseudocholinestérase.

Les techniques de dosage sont très nombreuses, et après un rappel des conditions nécessaires pour réaliser une détermination correcte, nous examinerons le principe des différentes méthodes proposées, ainsi que la précision de chacune d'elles.

II.- Conditions requises pour le dosage des cholinestérases

Elles ont été exposées par WITTER (111)

1.- conditions préliminaires

La vitesse de réaction mesurée doit être proportionnelle à la quantité d'enzyme présent. Il doit donc exister une relation directe entre la concentration de cholinestérase et son activité spécifique. D'autre part l'enzyme déterminé dans les conditions du dosage doit être de la cholinestérase.

2.- concentration en substrat

La vitesse de réaction catalysée par l'enzyme est dépendante de la concentration en substrat. Aussi on doit établir la quantité pour laquelle la vitesse d'hydrolyse sera maximum. Généralement on emploie un excès de substrat. Celui-ci ne devra pas être trop large à cause de l'inhibition possible de l'enzyme globulaire par des concentrations élevées d'esters de la choline.

3.- nature du substrat

La vitesse d'hydrolyse, pour un enzyme donné, varie avec le substrat utilisé. Pour la cholinestérase globulaire, les esters suivants sont hydrolysés à vitesse décroissante : acétylcholine > propionylcholine > butyrylcholine. L'ordre est inverse pour l'enzyme plasmatique. En dépit de son caractère hygroscopique, le substrat le plus employé est l'acétylcholine sous forme de chlorure. L'usage des substrats spécifiques préconisé par certains auteurs est discutable, car aucun ester de la choline n'est absolument spécifique pour une cholinestérase donnée.

4.- pH du milieu

En milieu acide, l'enzyme du plasma est détruit à pH 2, l'enzyme des globules rouges à pH 4,5. D'autre part l'activité des cholinestérases décroît beaucoup en milieu alcalin, où le substrat s'hydrolyse spontanément. Le pH optimum d'hydrolyse est de 7,5 à 8,5. D'autre part, pendant la durée d'une détermination, le pH ne doit pas varier, car il y aurait changement d'activité de l'enzyme. Aussi il est nécessaire d'utiliser des solutions tampons.

5.- température du milieu réactionnel.

A 56°, l'enzyme est détruit. Par contre à basse température, son action est très lente. L'optimum thermique est compris entre 35° et 40°, ce qui correspond aux conditions physiologiques. Aussi de nombreux auteurs réalisent-ils leurs déterminations à 37° ou 38°. Quelques uns ont opéré à température plus basse comme 25°. Ce qui a l'inconvénient de s'éloigner des réactions physiologiques. Il importe dans tous les cas de maintenir toujours la même température pendant la durée d'une expérience, et de la reproduire lors de déterminations successives.

6.- présence dans le milieu réactionnel d'ions métalliques.

Il a été montré que l'activité des cholinestérases dépendait de la présence de certains ions métalliques tels que K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} dans le milieu réactionnel. Aussi certains auteurs ont-ils préconisé des solutions tampons contenant des sels de ces métaux. En fait il semble admis que le sérum ou les globules rouges renferment une quantité suffisante de Ca^{++} ou de Mg^{++} . Cependant lors du prélèvement du sang, si l'on recueille sur citrate, oxalate ou fluorure, l'ion Ca^{++} est inactivé. Aussi on doit choisir comme anticoagulant l'héparine pour le dosage des cholinestérases.

7.- conservation des échantillons renfermant l'enzyme.

Elle doit dans tous les cas être réalisée à + 4°. Les globules rouges gardent leur activité 8 jours environ. Le plasma peut se conserver plus longtemps, environ 3 semaines. Néanmoins, il est conseillé dans la mesure du possible de réaliser le dosage dans les 48 heures qui suivent le prélèvement.

III.- Techniques utilisées pour le dosage des cholinestérases

Premier groupe : méthodes basées sur l'estimation de la quantité d'acide libéré.

Deuxième groupe : méthodes basées sur la détermination de l'acétylcholine qui n'a pas réagi.

Premier groupe

L'estimation de la quantité d'acide résultant de l'hydrolyse de l'acétylcholine peut être réalisée :

1.- par titrimétrie

a) avec indicateur interne

- b) avec indicateur externe
- c) par potentiométrie
- 2.- par la mesure d'un dégagement gazeux à l'aide d'un manomètre
- 3.- par détermination d'un abaissement de pH
 - a) méthode électrométrique
 - b) par les indicateurs colorés
- 4.- par les tests "de campagne"

Premier groupe : méthodes basées sur l'estimation de la quantité d'acide libérée.

1.- méthodes titrimétriques (10)

Elles consistent à titrer l'acide libéré au cours de l'hydrolyse au moyen d'un alcali standard.

a) en présence d'un indicateur interne.

On utilise rouge de crésol, bleu de bromothymol, phénolphtaléine (15) etc. L'indicateur est ajouté à la solution aqueuse d'acétylcholine et on verse de l'alcali jusqu'à obtenir le virage au point de neutralité. On mélange cette solution avec le liquide renfermant l'enzyme. Sous l'action de celui-ci, l'indicateur reprend peu à peu sa teinte "acide". Puis à intervalles de temps réguliers, on ajoute de l'alcali titré pour réobtenir le virage de l'indicateur. La quantité totale d'alcali ajoutée pour neutraliser l'acide libéré pendant un temps déterminé est utilisée comme unité d'activité (par exemple nombre de ml de Na OH 0,01N pour 1 ml de sérum par heure). Cette technique proposée par MORAND et LABORIT (82) est valable pour l'enzyme plasmatique. Elle est inapplicable pour les globules rouges, car leur teinte empêche l'observation des changements de couleur de l'indicateur.

b) en présence d'un indicateur externe.

C'est la technique du Professeur CHAMBON (19) inspirée de celle de STEDMAN et WHITE (98)

Le principe général est le même que le précédent. L'indicateur, en l'occurrence le bleu de bromothymol amené à la teinte vert jaune par addition de Na OH N/100 est disposé par gouttes sur une plaque de porcelaine. Les dosages se réalisent comme précédemment, mais on opère des touches successives de façon à ramener le milieu réactionnel au pH qui donne le virage au bleu clair de l'indicateur externe. Le dosage se poursuit 30 minutes et les résultats sont exprimés en unités CALLAWAY (13), qui seront définies lors de la description de la technique manométrique.

Ce dosage est bien entendu réalisable pour l'enzyme des globules rouges, car leur teinte ne gêne pas l'observation du virage de l'indicateur.

c) Techniques potentiométriques

Certains auteurs, pour avoir une meilleure précision, ont préconisé l'emploi d'un pH-mètre à électrode de verre. Le pH de la solution enzymatique est mesuré, puis on ajoute le substrat et au fur et à mesure de la réaction, l'alcali est ajouté au milieu réactionnel pour rétablir le pH initial. JENSEN-HOLM et ses collaborateurs (61, 62) ont même préconisé l'emploi d'un titratographe avec enregistrement automatique. Mais cet appareil dont le fonctionnement est délicat, n'est pas encore entré dans la pratique courante.

2.- Méthode manométrique à l'appareil de WARBURG.

Elle a été mise au point par AMMON (8), modifiée par AUGUSTINSON (10) et divers autres auteurs. (2, 13, 110)

L'hydrolyse de l'ester de la choline est réalisée en tampon bicarbonate-acide carbonique en atmosphère azote anhydride carbonique dans une fiole fermée reliée à un manomètre.

L'acide libéré réagit avec le bicarbonate pour produire de l'acide carbonique qui est aussitôt dissocié, d'où libération de CO_2 .



Le tampon bicarbonate doit obligatoirement renfermer du ClNa .

Le CO_2 dégagé provoque un changement du volume gazeux qui est mesuré à divers intervalles de temps au moyen du manomètre. Cette méthode de très grande précision sera détaillée plus loin dans les travaux expérimentaux. Le résultat est exprimé en μl de CO_2 dégagés en 30 minutes, ou en 1 heure selon les auteurs. Cependant CALLAWAY (13) qui a réalisé des dosages de cholinestérase selon cette technique, a défini une unité d'action cholinestérasique : c'est la quantité d'enzyme contenue dans 1/30 de ml de globules rouges ou de plasma qui libère à 38° en 30 minutes 1 μl de CO_2 dans le manomètre de WARBURG.

3.- Méthodes déterminant un abaissement de pH

a) méthode électrométrique de MICHEL (10, 23, 81)

La solution d'enzyme à déterminer est diluée dans un tampon phosphate-barbiturate à pH 8. Le pH de cette solution est déterminé à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre. Puis on ajoute le substrat. En même temps, on note l'heure. Au bout d'un temps déterminé, on note à nouveau le pH. Comme il y a production d'acide, cette valeur est inférieure à celle du pH initial. L'activité est calculée en faisant la différence entre les deux chiffres, et est exprimée en $\Delta \text{pH/h}$. Il est également possible par lecture successives de suivre l'abaissement du pH avec le temps.

Cette méthode qui semble commode présente quelques inconvénients. L'adjonction de substrat ne doit pas modifier le pouvoir tampon du système. Ce qui oblige à faire des vérifications et à rejeter certains lots d'acétylcholine pour cette détermination. D'autre part, l'activité de l'enzyme décroît de façon non négligeable avec la diminution du pH.

Les résultats exprimés en $\Delta \text{pH/h}$ ne sont pas directement convertibles en micromoles d'acétylcholine hydrolysées, sauf si l'on dispose d'un pH-mètre exactement calibré.

b) méthodes où l'abaissement de pH est suivi au moyen d'un indicateur coloré.

Ces techniques ont été principalement utilisées pour la détermination de la cholinestérase plasmatique ou sérique, car la teinte de l'indicateur se superpose à celle des globules rouges, ce qui gêne le dosage.

La solution enzymatique est diluée dans un tampon et on ajoute l'indicateur. Après addition du substrat, on laisse incuber un temps déterminé et mesure la

densité optique de la solution au spectrophotomètre à 540 mμ ainsi que celle d'un témoin sans substrat réalisé en même temps que le dosage. La différence des densités optiques donne l'activité de l'enzyme qui est également exprimée en Δ pH/h

Les indicateurs utilisés sont le rouge de phénol, le bleu de bromothymol, ou plus rarement le métanitrophénol. Dans la méthode de GREGOIRE et ses collaborateurs (49), la densité optique obtenue est rapportée à une courbe étalon déterminée par mesure spectrophotométrique de solutions d'acide acétique de concentrations connues et croissantes en présence de rouge de phénol.

L'inconvénient majeur de ces techniques est qu'elles sont inutilisables pour la détermination de la cholinestérase globulaire, ce qui leur enlève beaucoup de leur intérêt.

4.- Tests dits "de campagne" (111)

On appelle tests "de campagne" des déterminations de cholinestérase sur le sang total, nécessitant un matériel très simple et applicables pour détecter sur place un début d'intoxication chez les ouvriers traitant des cultures au moyen d'insecticides organophosphorés. Ces tests consistent à mettre le sang à tester en contact avec le substrat et un indicateur coloré. On apprécie le changement de couleur par rapport à une gamme étalon. D'autres techniques mesurent le temps nécessité par l'indicateur pour atteindre une couleur bien déterminée.

Ces tests sont commodes à réaliser, mais peu précis et doivent être réservés au dépistage d'intoxications éventuelles.

Deuxième groupe : méthodes basées sur la détermination de l'acétylcholine qui n'a pas réagi.

En solution alcaline, l'acétylcholine réagit avec l'hydroxylamine pour former un acide hydroxamique. Ce dernier en solution acide forme un complexe coloré avec les sels ferriques, dosable par spectrophotométrie entre 520 et 540 mμ.

L'équation chimique de la réaction a été donnée page 8.

De la densité optique lue, on déduit la quantité d'acétylcholine présente.

Cette réaction a été mise au point par HESTRIN (53) et ensuite appliquée par d'autres auteurs au dosage des cholinestérases. La solution d'enzyme est diluée en milieu tamponné. Elle est mise en présence d'une quantité exactement déterminée et excédentaire d'un ester de la choline dans le même tampon. On note l'heure et on laisse incubé pendant 30 minutes par exemple, en même temps qu'un témoin substrat ne renfermant pas d'enzyme et un témoin réactif constitué seulement par du tampon. Puis on stoppe la réaction enzymatique de diverses manières selon les auteurs. On élimine ensuite les protéines par filtration ou centrifugation. On pratique alors la réaction de HESTRIN dans tous les tubes.

En faisant la différence entre les densités optiques du témoin substrat et du tube renfermant l'enzyme, on détermine la quantité d'acétylcholine qui a été hydrolysée. Le résultat est exprimé en micromoles de substrat hydrolysées en 30 minutes. Il s'agit d'un dosage par différence.

De très nombreuses techniques ont été publiées et un certain nombre d'entre elles seront décrites en détail dans les travaux expérimentaux.

D'autres méthodes de dosage des cholinestérases, beaucoup moins importantes que les précédentes, ont été décrites. Nous nous bornerons à les citer : hydrolyse des esters de la thiocholine sous forme d'iodure suivie d'un dosage iodométrique (MEYER et WILBRANDT) (80) ou d'une détermination colorimétrique de la thiocholine (ELLMAN et ses collaborateurs) (38); emploi comme substrat de la β carbonaphtoxy-choline avec dosage colorimétrique de β naphтол libéré (AUGUSTINSON) (10) et par des auteurs russes du subérate de dicholine (LINYUCHEV) (69)

Valeur des techniques utilisées pour le dosage des cholinestérases.

Les deux techniques considérées comme les plus précises sont la méthode titrimétrique par potentiométrie à pH constant, et la méthode manométrique. La première étant de réalisation difficile, c'est la seconde qui sert la plupart du temps de méthode de référence.

Pour les déterminations en série, les méthodes titrimétriques avec emploi d'indicateur externe, électrométrique et colorimétrique d'après la réaction de HESTRIN donnent des résultats satisfaisants.

Les techniques utilisant des indicateurs de pH ont le grave inconvénient de n'être réalisables que pour la détermination de la cholinestérase plasmatique.

Enfin les tests "de campagne", peu précis, mais commodes à réaliser, peuvent rendre des services pour le dépistage des intoxications par les organophosphorés et permettre d'intervenir sans délai, alors que la réponse du laboratoire demanderait un temps trop long.

QUATRIEME CHAPITRE

L'HYPODERMOSE BOVINE.

I) Historique

Nous avons vu plus haut que les composés organophosphorés se comportaient en insecticides systémiques : ils persistent dans les végétaux un certain temps et permettent ainsi une meilleure destruction des insectes. Puis on a recherché des "systémiques animaux" qui seraient de faible toxicité pour les animaux à sang chaud, tout en ayant un fort pouvoir insecticide, ce qui permettrait de lutter contre certaines maladies parasitaires et en particulier contre l'hypodermose bovine. (64)

Dès 1954, MAC GREGOR et ses collaborateurs (72) ont essayé dans ce but divers composés organophosphorés par voie buccale ou injection sous-cutanée. Les résultats furent très encourageants et devaient amener par la suite la découverte et l'utilisation d'un grand nombre de produits.

Avant de passer en revue les différents composés organophosphorés utilisés dans les traitements contre le varron, nous allons rappeler le cycle de l'hypoderme, les dégâts qu'il cause et citer les anciennes méthodes de lutte contre cette maladie parasitaire.

II) Cycle biologique de l'hypoderme

Pour la description des différents stades du cycle biologique de l'hypoderme, nous nous sommes inspirés de la revue de GREGOIRE : "L'hypodermose bovine en Belgique" (48)

L'hypoderme ou varron est un diptère brachycère de la famille des Oestridés. Nous n'étudierons que les 2 espèces dont la larve vit en parasite sur l'espèce bovine. Ces insectes sont répandus dans tous les pays de la zone tempérée.

1.- l'insecte adulte

C'est un insecte ailé de forme trapue, de longueur 13 à 15 mm. Sa tête est volumineuse avec yeux saillants et pièces buccales rudimentaires. Il ne se nourrit pas et sa vie est très courte, ne dépassant pas 6 jours. Tout son corps est couvert de poils de teintes diverses, et l'abdomen porte trois bandes parallèles : blanche, noire et jaune orangé. Chez H. bovis, la troisième ceinture abdominale est jaune citron.

2.- la ponte des oeufs

La mouche du varron ne vole que par temps ensoleillé. Son vol qui s'accompagne d'un bourdonnement caractéristique provoque chez le bétail une frayeur panique qui le pousse à fuir jusqu'à un endroit ombragé (courses de chaleur). Aussi la mouche attaque-t-elle de préférence les veaux qui sont moins rapides. Elle pond

quelques centaines d'oeufs en diverses régions du corps de l'animal. La période de ponte varie avec l'espèce de l'hypoderme : de mai à juillet pour *H. lineatum*, de juin à septembre pour *H. bovis*. Les oeufs sont de petits éléments blanchâtres de 1 mm de long, en forme de massue. Ils sont fixés par deux languettes qui enserrant le poil.

3.- larves du 1er stade

Des oeufs sortent de petites larves vermiformes de 0,6 mm qui pénètrent dans l'organisme de l'animal selon deux voies possibles :

- par le tube digestif : l'animal en se léchant avale les larves.
- par voie transcutanée, possible par les solutions de continuité du revêtement cutané.

Les larves migrent dans l'organisme et vont se fixer dans la sous-muqueuse oesophagienne (*H. lineatum*) ou dans le canal rachidien (*H. bovis*). Là elles se développent pour atteindre 15 mm. Puis elles subissent une première mue.

4.- larves du 2ème stade.

Les larves reprennent leur migration et gagnent les régions supérieures du corps. Elles traversent les masses musculaires de l'animal, ce qui les amène sous la peau des régions antérieures du dos. Là, elles subissent une seconde mue.

5.- derniers stades larvaires

Alors que précédemment les larves étaient aptes à respirer au sein même des tissus par un processus anaérobie, leur respiration devient aérobie. Ce qui oblige la larve du 3ème stade à creuser un petit puits à travers la peau et à se retourner pour engager dans l'ouverture ses stigmates qui lui permettront de respirer.

Cette larve est sédentaire et se maintient en place environ 55 jours pour *H. lineatum*, 75 jours pour *H. bovis*. Au cours de ce séjour, elle se transforme.

Au début du 3ème stade, elle est blanche, en forme de massue allongée de 15 mm, segmentée en 11 anneaux. Petit à petit la larve grossit, la cuticule s'épaissit et se garnit d'épines.

Au contact de la larve, le tissu conjonctif sous-cutané présente une réaction inflammatoire. Il se forme une tumeur remplie de pus dont la larve se nourrit.

Au 4ème stade, le varron a l'aspect d'un petit tonnelet noirâtre de 28 mm. de long.

6.- sortie des larves mûres. Etat nymphal

Elle a lieu d'avril à juin pour *H. lineatum*, de mai à août pour *H. bovis*.

La larve sort par l'ouverture qui lui permettait de respirer et tombe au sol. Elle reste mobile 1 à 3 jours, temps qu'elle utilise à creuser une galerie parallèle à la surface du sol. Puis elle s'immobilise en position oblique, la tête tournée vers le haut. Elle se transforme alors en nymphe. La cuticule se durcit et l'on remarque un sillon délimitant un opercule par lequel sortira l'insecte adulte.

L'état nymphal dure de 25 à 70 jours. Une atmosphère humide est très défavorable aux larves et les empêche d'éclore.

Le cycle de l'hypoderme se termine donc par la transformation de la nymphe en insecte adulte. La durée totale de ce cycle est d'environ 1 an.

III) Dégâts causés par l'hypodermose bovine (47, 48)

L'hypodermose bovine n'est pas une maladie spectaculaire et n'est pour ainsi dire jamais mortelle. Aussi cette infection passa t'elle très longtemps inaperçue. Cependant un certain nombre d'observations prouvent que l'hypodermose bovine cause des préjudices aux animaux, et au cuir de ceux-ci.

1.- accidents pathologiques

Ils sont très rares. On a signalé des troubles digestifs dus au stade oesophagien d'*H. lineatum*, des accidents de compression médullaire provoqués par les larves d'*H. bovis* qui séjournent dans le canal rachidien. Les "courses de chaleur" peuvent être la cause d'entorses ou de luxations. L'évarromage manuel dont nous parlerons plus loin provoquait des accidents de type anaphylactique dus à une sensibilisation de l'animal par les protéines de la larve. Enfin les tumeurs varroneuses sont parfois le siège d'infections bactériennes et se transforment en abcès purulents.

2) diminution de la production animale

Elle n'est visible que dans le cas d'animaux fortement infestés. L'hypodermose bovine atteignant surtout les animaux jeunes provoque chez ceux-ci un retard de croissance, d'où pertes en viande au point de vue boucherie. On admet également que cette maladie parasitaire est nuisible à la production laitière. Ces faits ont été établis par comparaison entre des animaux parasités et indemnes.

3) dommages causés aux cuirs bruts

La larve perce son orifice dans la région dorsolombaire de l'animal. Or cette partie constitue en tannerie le croupon, cuir très épais utilisé en industrie. Une fois le varron expulsé, ce trou est colmaté par un tissu cicatriciel formé de fibres de collagène, mais orientées dans une seule direction. Le cuir ainsi taré supporte très mal le tannage et offre des points de moindre résistance qui nuisent à la qualité de l'objet manufacturé. La présence de quelques cicatrices de varron fait classer le cuir dans une qualité inférieure. Si elles sont nombreuses, la dépouille de l'animal est inutilisable. Il en résulte des pertes importantes pour l'industrie du cuir.

CINQUIEME CHAPITRE

LA LUTTE CONTRE LE VARRON

(généralités, méthodes anciennes) (47, 48, 96).

I) les problèmes que pose la destruction du parasite

Pour lutter contre l'hypodermose, l'intervention peut théoriquement se faire à trois stades de l'évolution du parasite.

1) destruction de l'insecte ailé et de ses premières larves.

Vu la brièveté de vie de la mouche d'hypoderme, il faudrait réaliser des traitements très fréquents, et à une période où le bétail est au pré. Ce qui pose des problèmes tels que cette méthode est inapplicable.

2) destruction des larves en migration

Ce serait certainement la meilleure technique de lutte. Nous en reparlerons plus loin à propos des composés organophosphorés utilisés pour les traitements préventifs.

3) destruction de la larve en place sous la peau

Cette méthode fut la seule utilisée pendant longtemps. Certains traitements utilisés s'appliquèrent à tuer la larve après qu'elle ait perforé la peau. La méthode a l'inconvénient de laisser un cuir taré. Aussi on s'est demandé s'il n'y aurait pas moyen de détruire la larve avant qu'elle ait perforé la peau. Il faut donc trouver des produits qui soient suffisamment pénétrants pour traverser le cuir.

Une méthode correcte de traitement doit remplir quatre conditions :

a) elle doit être efficace, ce qui dépend de l'activité de la substance, de la voie d'administration, de la fréquence et du moment des applications.

b) elle doit présenter une innocuité parfaite. Il est essentiel que le produit soit absolument sans danger pour les animaux et le personnel qui réalise le traitement.

c) l'application de la méthode doit être simple et réalisable sur un grand nombre d'animaux.

d) le prix de revient ne doit pas être trop élevé.

II) Les diverses méthodes de traitement contre le varron

Avant d'envisager les divers modes de traitement contre le varron, nous allons définir les termes de "préventif" et de "curatif" qui sont couramment utilisés.

On entend ici par traitement curatif l'application d'un parasiticide destiné à détruire la larve une fois qu'elle est en place sous la peau.

Par contre les traitements préventifs visent à agir sur les larves d'hypoderme en cours de migration, avant qu'elles ne soient arrivées sous la peau, ce qui préserve le cuir de toute perforation.

Il serait plus correct de parler pour le premier de traitement tardif ou de printemps, et pour le second de traitement précoce ou d'automne. Celui-ci est réalisé à la rentrée du bétail à l'étable, c'est-à-dire entre fin octobre et début décembre.

1) méthode la plus ancienne : l'évarrornage manuel

Elle consistait à presser la tumeur avec les doigts de manière à faire sortir la larve. Cette méthode avait l'inconvénient de laisser un cuir perforé, et de plus il y avait risque de choc anaphylactique pour l'animal. La technique, peu efficace, est actuellement abandonnée.

2) traitements curatifs au moyen de produits insecticides divers.

Puisque la larve communique avec l'extérieur par son pertuis respiratoire, il est facile de l'atteindre par cette voie, et de la détruire au moyen d'insecticides. Les traitements sont effectués au printemps avant la sortie du bétail au pré et doivent être répétées, les larves ne se fixant pas toutes sous la peau au même moment.

De nombreux produits ont été utilisés. Le DDT et le Gammexane sont peu actifs. Des auteurs américains ont essayé la dieldrine, insecticide organochloré qui a l'inconvénient majeur d'être trop toxique.

Pendant de nombreuses années en France, les traitements étaient réalisés à l'aide d'une pommade au paradichlorobenzène. Elle n'était pas dénuée d'efficacité, mais son application était longue et fastidieuse.

Plus récemment ont été essayé avec succès les produits roténonés : extraits de Derris et de Cubé, qui ne sont pas toxiques pour les animaux et qui conservent actuellement un intérêt certain pour les traitements curatifs.

Depuis une dizaine d'années, les traitements antivarron, aussi bien curatifs que préventifs, sont réalisés de plus en plus fréquemment à l'aide d'insecticides organophosphorés.

Vu l'importance prise par cet aspect de la thérapeutique contre l'hypodermose bovine, nous lui consacrerons un chapitre particulier.

SIXIEME CHAPITRE

EMPLOI D'INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORES DANS LA LUTTE CONTRE LE VARRON (75).

Ces produits , véritables "systémiques animaux", ont été utilisés dans le but de détruire les larves d'Hypoderme en migration, avant leur arrivée sous la peau. Ce qui présente un énorme avantage : les bovidés débarrassés de leurs varrons ont une croissance normale et leur cuir reste intact.

Nous allons exposer les principaux produits utilisés (leurs formules chimiques ont été données page 14 et 15) et les résultats obtenus.

1) Thiophosphate de diéthyle et de paranitrophényle = Parathion.

Ce produit fut expérimenté dans la lutte contre le varron vers les années 1950-51. La firme BAYER commercialisa à cette époque le "SEBACIL" à base de méthylparathion.

Ces composés furent rapidement abandonnés par suite de leur haute toxicité et de leur efficacité discutable.

2) Trichloro 2,2,2, hydroxy 1 éthyl phosphonate de diméthyle. Bayer L 13/59. Néguvon, Trichlorfon.

En 1954, MAC GREGOR et ses collaborateurs (72) ont administré à des bovins et par voie buccale un nouveau composé organophosphoré : le Bayer L 13/59. Ils ont montré que ce produit était capable de détruire non seulement les larves en place sous la peau, mais aussi certaines larves en migration.

En 1956, l'Institut de Recherches pour les Industries du Cuir à LYON (16) réalisait des traitements externes à l'aide de préparations insecticides à base de produits mouillants, incorporés dans le but de faciliter la pénétration du principe actif à travers la peau. Bien que la voie d'introduction soit différente, l'efficacité du Bayer L 13/59 est confirmée. (17)

Sous le nom de Néguvon, ce produit est largement expérimenté à la même époque par ROSENBERGER (92). Les résultats furent remarquables et ce composé devait être très largement utilisé par la suite sous le nom de Trichlorfon.

D'abord administré par voie orale, et par pulvérisations sur tout le corps du bovin, le Trichlorfon fut ensuite utilisé par voie percutanée. Cette dernière méthode fut appelée "Pour-On" par ROGOFF et KOHLER (91). Elle consiste à mettre l'organophosphoré en solution en présence d'un mouillant, et à verser le liquide sur la région dorsolombaire de l'animal, lentement afin d'éviter les pertes. Les poils retiennent le produit qui pourra pénétrer à travers le cuir et manifester son activité vis à vis des larves.

C'est la méthode de choix pour les traitements préventifs qui doivent être réalisés à la fin de l'automne, époque où les larves se déplacent dans le corps de l'animal.

3) Thiophosphate de diméthyle et de trichloro 2,4,5 phényle.Dow ET 57, Ronnel, Etrolène, Fenchlorphos.

En 1957 aux Etats-Unis, ADKINS (1) et MAC GREGOR et BUSHLAND (73) expérimentent sur une grande échelle un nouvel organophosphoré : le Dow ET 57. Il est administré sous forme de bols ou de breuvages. L'efficacité sur les larves d'hypoderme se révèle excellente.

Mais la même année RADELEFF et WOODARD (89) insistent sur la toxicité de ce produit vis à vis des bovins.

Les essais ont été repris par Messieurs les Professeurs TAPERNOUX et MAGAT. (36,99). Ils administrent le Ronnel par voie orale et signalent qu'il a donné lieu à des accidents chez les bovidés. Ils ont même constaté 4 cas de mort sur 1566 animaux traités.

La même année, WEBLEY (108) montra que le Fenchlorphos administré par voie orale à des bovidés a pu être décelé en quantité non négligeable dans le lait. Il en résulte des possibilités éventuelles d'intoxication.

4) Thiophosphate de diméthyle et de mercapto méthylcarbamate de N méthyle. Diméthoate, Rogor.

La première utilisation de ce composé comme agent chimiothérapique a été effectuée en 1958 aux Etats-Unis par HEWITT et ses collaborateurs (54).

Pendant l'hiver 1958-59, il fut essayé par Messieurs les Professeurs TAPERNOUX et MAGAT par la voie intramusculaire avec d'excellents résultats (46).

En 1962 et 1963, le Diméthoate fut appliqué cette fois par voie percutanée ("Pour-On"). Les résultats ne furent satisfaisants qu'à la dose assez élevée de 30 mg/Kg (100,101).

5) N méthyl O-O diméthyl dithiophosphoryl 5 thio 3 diméthyl 2,2 valéramide- 13.072 R.P. , Sisvar.

Ce produit a été synthétisé par la firme RHONE-POULENC et expérimenté par Monsieur le Professeur MAGAT au cours de l'hiver 1963-64 par voie percutanée (74). Les résultats furent excellents.

Le stade expérimental franchi, l'utilisation des composés organophosphorés précédents dans la lutte contre le varron se présente ainsi :

Le Trichlorfon est actuellement commercialisé :

- par les laboratoires BAYER sous le nom de NEGUVON
- " " " T.H.E.R.S.A. (PARIS) " NECROVAR
- " " " S.O.F.C.A. (PARIS) " VARKILL

L'Etrolène, par suite des accidents qu'il a provoqué n'est plus utilisé actuellement.

Le Diméthoate qui est utilisé comme insecticide reste encore au stade expérimental en ce qui concerne son emploi dans la lutte contre le varron.

Enfin le 13.072 R.P. a été tout récemment commercialisé par les laboratoires Roger BELLON sous le nom de SISVAR.

L'efficacité, la toxicité et le pouvoir anticholinestérasique du Trichlorfon, du Diméthoate et du 13.072 R.P. seront étudiés au cours des travaux expérimentaux que nous avons effectués en collaboration avec Monsieur le Professeur MAGAT. Il sera discuté également du problème éventuel de la toxicité de ces produits chez les agriculteurs qui réalisent les traitements.

SEPTIEME CHAPITRE

L'HYPODERMOSE CHEZ L'HOMME

Si l'hypodermose bovine est très répandue dans les pays d'élevage, elle peut expliquer dans une certaine mesure l'existence d'une infestation chez l'homme, bien que peu fréquente.

Néanmoins une récente observation parue dans la Presse Médicale (50) témoigne de son actualité et nous incite à rapporter brièvement quelques aspects fondamentaux de l'hypodermose chez l'homme. Le sujet a été largement traité dans la thèse de A. VINCENT (105) : Myiases humaines à Hypoderme.

Cette maladie qui atteint les enfants est rare, mais non exceptionnelle. On en signale quelques cas chaque année en France.

Après contamination, soit par ponte directe de la mouche d'hypoderme sur l'homme, soit par l'intermédiaire des mains souillées ou du lait, la larve se trouve ici dans un milieu défavorable. Elle ne dépasse pas le 2ème stade larvaire et est incapable de se transformer en insecte adulte. Néanmoins la larve migre comme chez les bovidés, mais de façon plus désordonnée. Les formes principales sont :

1) la myiase rampante sous-cutanée

Elle se manifeste par un point douloureux cutané très vif, qui se déplace de façon continue en laissant une trainée sinueuse de consistance oedémateuse. La lésion est fortement prurigineuse.

2) la myiase sous-cutanée à tumeurs ambulatoires

Elle se caractérise par l'apparition d'une tuméfaction avec oedème gélatineux, accompagnée de douleurs très vives. Au bout de quelques jours, elle s'atténue et il apparait une seconde tuméfaction un peu plus loin, ce qui signe le caractère migrateur de la larve.

Celle-ci se déplace pendant quelque temps selon ce processus, puis se fixe dans une dernière tuméfaction qui prend l'aspect d'un furoncle. Puis la larve bien qu'immature sort par le bourbillon, ce qui entraîne la guérison du malade si la larve est unique.

3) la myiase oculaire

C'est une localisation anormale de la larve qui se fixe dans la chambre interne de l'oeil, provoquant des troubles très importants de la vision. Cette forme est particulièrement grave. Elle nécessite l'extraction chirurgicale de la larve, ce qui le plus souvent entraîne la perte de la vue pour l'oeil atteint.

4) forme nerveuse

Il n'en a été publié que deux cas où la larve pénétrant dans le canal rachidien aurait provoqué dans la 1ère observation une arthralgie cervicale et dans la 2ème une paraplégie complète des membres inférieurs.

Seulement il est extrêmement difficile de faire le rapprochement entre des troubles nerveux et l'hypodermose. Ce qui pourrait expliquer le faible nombre de

cas publiés. Il est vraisemblable que la localisation nerveuse de la larve est plus fréquente, mais échappe au diagnostic.

L'hypodermose chez l'homme se révèle encore, ce qui n'est pas spécifique, par une hyperleucocytose et une éosinophilie. Cette affection est souvent de diagnostic difficile.

Le seul mode de traitement connu consiste en l'extraction de la larve.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Etant donné que pratiquement le diagnostic d'une éventuelle intoxication par les composés organophosphorés repose sur un dosage des cholinestérases sanguines, nous nous sommes proposés dans une première partie d'effectuer la comparaison entre les diverses méthodes de dosage, de manière à pouvoir choisir une technique suffisamment précise et qui se prête en même temps aux dosages en série.

Après une comparaison du taux des cholinestérases sanguines chez l'homme et divers animaux, nous étudierons sur le chien et les bovidés le pouvoir anticholinestérasique de quelques produits organophosphorés utilisés dans la lutte contre le varron. Nous essayerons d'en tirer des conclusions sur la toxicité de ces produits.

PREMIERE PARTIE

ETUDE ANALYTIQUE DES METHODES DE DOSAGE DES CHOLINESTERASES.

Pour effectuer un choix parmi les méthodes analytiques proposées par les auteurs, nous avons retenu la technique manométrique d'AMMON, modifiée par AUGUSTINSON, très précise et qui peut servir de méthode de référence, et la détermination colorimétrique de l'acétylcholine qui n'a pas réagi après hydrolyse, d'après la réaction de HESTRIN. Cette technique de précision moyenne est plus simple à réaliser que la précédente.

De nombreux protocoles expérimentaux ont été publiés et nous effectuerons une étude de chacun d'eux afin de pouvoir les comparer.

A) Méthode manométrique

Nous avons adopté la technique de manipulation décrite dans "Manometric Techniques" par UMBREIT et ses collaborateurs (103)

I.- Description et fonctionnement de l'appareil de WARBURG.

Nous avons utilisé un appareil de marque B. BRAUN (Melsungen) modèle V 85.

1) Description

L'appareil de WARBURG comprend :

- un bain-marie dont la température est maintenue constante au moyen d'un thermostat. Celui-ci fonctionne à l'aide d'un thermomètre de contact qui donne la

température désirée. Un dispositif d'agitation favorise l'uniformité de la température de l'eau du bain-marie. Le tout fonctionne électriquement et le courant du secteur traverse un transformateur avant d'arriver à l'appareil.

- un support pour fixer les manomètres, relié à un dispositif permettant leur agitation au cours de l'expérience.

- des manomètres et des fioles exactement calibrés, reliés entre eux par des rodages. Les fioles renferment une cupule centrale et un bras latéral permettant d'ajouter des substances en cours d'expérience. Ce bras latéral est fermé par un bouchon purgeur. Au sommet de chaque manomètre se trouve un robinet à trois voies permettant la communication du manomètre avec l'extérieur, de façon à pouvoir réaliser le passage d'un mélange gazeux dans l'espace libre du manomètre. Sa partie inférieure se termine par un caoutchouc renfermant le liquide manométrique de BRODIE et une pince à vis permettant d'en faire monter le niveau dans les deux branches du manomètre.

2) Préparation du mélange gazeux destiné à la réalisation de la manipulation.

L'atmosphère des manomètres doit dans les conditions où nous opérons, être constituée d'un mélange à 95 % d'azote et 5 % de CO_2 . Aussi avant de décrire le protocole expérimental de la manipulation à l'appareil de WARBURG, nous donnerons la technique de préparation du mélange gazeux.

Il est réalisé dans une fiole de contenance 5 litres munie d'un robinet à sa partie inférieure et fermée par un bouchon à deux trous. L'un est occupé par une ampoule dont un robinet permet l'écoulement du liquide pour chasser le mélange dans les manomètres. L'autre renferme un tube coudé fermé lui aussi par un robinet.

La fiole est entièrement remplie d'eau permutée saturée de CO_2 afin d'éviter une dissolution de celui-ci lorsque le mélange gazeux est laissé au repos. Sa préparation se déroule en deux temps :

a) remplissage de la fiole en azote.

Après ouverture de la bouteille d'azote, on la relie à la fiole par un tuyau en caoutchouc que l'on adapte au tube coudé. On ouvre aussitôt le robinet. En même temps on fait écouler l'eau par la partie inférieure. Il faut réaliser ces opérations rapidement afin d'éviter des surpressions.

Le courant d'azote doit être lent et l'on en fait passer dans la fiole 4,750 litres. Puis on ferme tous les robinets. On coupe ensuite la communication avec la bouteille d'azote.

b) passage du CO_2 dans la fiole contenant déjà l'azote.

Les 250 ml de CO_2 sont introduits dans la fiole à l'aide d'une burette à gaz type burette de BUNTE remplie également d'eau saturée de CO_2 et reliée à un vase de Mariotte.

Dans un 1er temps, on envoie le CO_2 dans la burette à gaz après avoir relié le tube latéral de celle-ci à la bouteille et ouvert les robinets.

Le 2ème temps consiste à faire passer le CO_2 dans la fiole contenant déjà l'azote par une manœuvre classique de refoulement.

Le mélange est ainsi prêt à l'emploi. Sa conservation est limitée et on doit le préparer avant chaque manipulation.

3) Technique d'utilisation de l'appareil de WARBURG

Il convient tout d'abord d'amener le bain-marie à la température désirée. Après réglage du thermomètre de contact, on branche l'appareil et allume le voyant rouge au moyen de l'interrupteur. On met en marche le chauffage rapide. Lorsque la température est atteinte, le voyant rouge s'éteint et le jaune s'allume. Il faut immédiatement interrompre le chauffage rapide. On se rend compte ensuite du bon fonctionnement du thermostat par le clignotement régulier des deux voyants, et la constance de la température.

Pendant le chauffage, on procède au remplissage des fioles, et de leurs bras latéraux avec les réactifs appropriés. On relie les fioles aux manomètres au moyen de petits ressorts et porte l'ensemble sur le support de l'appareil. Puis on amène le niveau du liquide manométrique de BRODIE à 15 en manoeuvrant la vis inférieure.

Les robinets et bouchons purgeurs étant en communication avec l'atmosphère, on procède au passage du mélange gazeux. Pour cela, on relie le tube coudé de la fiole à la tige supérieure du manomètre à l'aide d'un tuyau en caoutchouc. On ouvre les robinets. L'eau s'écoule et chasse le mélange gazeux. Au bout d'un temps déterminé, on ferme tous les robinets et bouchons purgeurs. Puis on passe au manomètre suivant.

Une fois cette opération terminée, on déclanche le mécanisme d'agitation de façon à réaliser l'équilibre des températures à l'intérieur du manomètre. Toutes les 5 minutes, on ouvre le bouchon purgeur pour rétablir l'équilibre entre les deux branches du manomètre. Cette opération doit être effectuée avec précaution pour ne pas mettre le mélange gazeux en dépression. Lorsque les deux branches du manomètre restent 5 minutes au même niveau, l'équilibre est réalisé et on peut commencer l'expérience.

Le liquide de BRODIE étant à 15 dans la branche droite du manomètre, on lit la hauteur de la colonne dans la branche gauche. Celle-ci est d'ailleurs généralement très proche de 15. Puis on sort les manomètres du bain un à un en les basculant de façon à mélanger les liquides qui doivent entrer en réaction. On remet le tout en place. Ces opérations doivent être réalisées rapidement. Puis on déclanche le mécanisme d'agitation. On l'arrête toutes les 5 à 10 minutes pour ramener la branche droite du manomètre à 15 et lire la dénivellation sur la branche gauche.

Pour toutes les expériences, il est recommandé de faire un témoin des réactifs et un thermobaromètre avec une fiole ne contenant que de l'eau distillée, ce qui permet de contrôler les variations de température et de pression.

Pour calculer le nombre de microlitres de CO_2 dégagés pendant la durée de l'expérience, on corrige la hauteur lue par celle observée sur le thermobaromètre puis on multiplie le résultat obtenu par la constante de cuve K qui est donnée par la formule :

$$K = \left[Vg \times \frac{273}{T} + Vf\alpha \right] \frac{I}{Po}$$

Vf : volume de liquide contenu dans la fiole

Vg : (volume total du manomètre et de la fiole) * - Vf

T : température de l'expérience (en température absolue)

α : coefficient de solubilité de CO_2 à la température de l'expérience.

à 25° $\alpha = 0,759$

à 37° $\alpha = 0,567$

Po : pression standard (pour le liquide de BRODIE = 10.000 mm)

II.- Etude de la réaction acide-bicarbonate par la technique manométrique.

Au cours du dosage des cholinestérases par la méthode manométrique d'AMMON (8), l'acide acétique provenant de l'hydrolyse de l'acétylcholine réagit sur le bicarbonate de la solution tampon ajoutée au mélange en produisant un dégagement de CO_2 que l'on mesure à l'aide du manomètre.

* Ce volume total est indiqué par le constructeur sur chaque manomètre et sur chaque fiole.

Si l'on fait agir une solution titrée d'acide acétique sur le bicarbonate, une quantité de CO_2 qu'il est possible de calculer doit être libérée et nous avons recherché dans quelles conditions le volume de CO_2 effectivement dégagé se rapproche le plus du chiffre théorique.

1) réactifs utilisés

a) solution de RINGER bicarbonatée (d'après AUGUSTINSON)

On prépare les solutions stocks suivantes :

- Cl Na à 0,9%

- $\text{CO}_2\text{H Na}$ à 1,26%

- $\text{Cl}_2\text{Mg}, 6 \text{ H}_2\text{O}$ à 1,76%

Au moment de l'emploi, on réalise le mélange suivant :

- 100 ml de solution de Cl Na

- 30 ml de solution de CO_2HNa

- 2 ml de solution de $\text{Cl}_2\text{Mg}, 6 \text{ H}_2\text{O}$

Cette solution est saturée par le mélange 95% N_2 / 5% CO_2 jusqu'à pH 7,4. Le mélange est utilisable 2 à 3 jours s'il est conservé à + 4°. Mais il convient de le resaturer en CO_2 avant chaque manipulation.

b) solution titrée de $\text{CH}_3 - \text{COOH}$

Le titre de la solution doit être tel que le dégagement de CO_2 soit compris entre 100 et 150 μl . En tenant compte du fait que le volume de liquide contenu dans les fioles ne peut excéder 3ml, il est nécessaire de préparer des solutions très diluées. Aussi nous avons préparé un acide environ N que nous avons titré. Avant chaque manipulation, nous avons réalisé la dilution de l'acide acétique N pour l'amener au titre de N/500.

2) Mode opératoire

Il est nécessaire de déterminer la quantité de réactifs à introduire dans les compartiments centraux et bras latéraux des fioles. L'acide doit obligatoirement être dans le compartiment central. En effet, lorsqu'on verse le liquide du bras latéral, il en reste toujours un peu après les parois. Or il est nécessaire d'opérer avec une quantité d'acide exactement connue. Nous en mettons 2 ml dans le compartiment central, et dans le bras latéral, 0,5 ml de Ringer, quantité calculée pour opérer en présence d'un excès de CO_2HNa . Les fioles et manomètres sont portés au bain-marie à 37°. Après passage du mélange gazeux et équilibre des températures, nous versons le bicarbonate dans l'acide et mesurons la quantité de CO_2 dégagée toutes les 5 minutes pendant 15 à 20 minutes.

3) Expériences effectuées

Une 1ère manipulation a été réalisée avec $\text{CH}_3 - \text{COOH}$ N/400 après titrage de la solution environ N. Celle-ci est en fait 1,03 N. Pour éviter toute rétention de CO_2 par les solutions de Ringer et du $\text{CH}_3 - \text{COOH}$, celles-ci ont été saturées 5 minutes avec CO_2 pur, sans tenir compte du pH obtenu.

Numéros des manomètres	Résultat (μl de CO_2 dégagés)
1	116,5
2	117
3	116
4	117
5	119
6	116
Moyenne	117

La quantité de CO_2 théoriquement dégagée à 37° par les réactifs mis en présence est de $127 \mu\text{l}$.² Les résultats obtenus sont tous trop faibles.

Pour l'expérience suivante, nous maintenons la saturation de la solution de $\text{CH}_3\text{-COOH}$ N/400 à 5 minutes avec CO_2 pur. Mais les auteurs utilisant une solution tampon à pH 7,4, nous faisons barbotter le mélange N_2/CO_2 dans la solution bicarbonatée sous contrôle du pH mètre jusqu'à l'obtention d'un pH de 7,4.

Numéros des manomètres	Résultats (μl de CO_2 dégagés)
1	106
2	109
3	106
4	108
5	109
Moyenne	107,5

Les résultats obtenus dans cette dernière expérience sont bien plus faibles que précédemment. Aussi nous avons pensé que cela pouvait provenir de la mesure trop imprécise au cours de la préparation de l'acide N/400.

C'est pourquoi les manipulations suivantes ont été réalisées avec un acide acétique N/500, après jaugeage des pipettes utilisées pour les diverses dilutions afin d'éliminer d'éventuelles erreurs dues au matériel. La saturation de la solution de Ringer est toujours réalisée sous contrôle du pH mètre.

a) solution de Ringer pH 7,2

Numéros des manomètres	Résultats (μl de CO_2 dégagés)
1	89
2	98
3	99,5
4	92
5	91,5
Moyenne	94

La quantité théorique de CO_2 dégagée étant ici de $102 \mu\text{l}$, les résultats obtenus sont toujours trop faibles.

b) solution de Ringer pH 6,5

Numéros des manomètres	Résultats (μl de CO_2 dégagés)
1	94
2	93
3	95
4	87
5	97
Moyenne	93

Les résultats sont plus éloignés du chiffre théorique qu'à pH 7,2

c) Solution de Ringer pH 7 (saturée 1 minute avec CO_2 pur)

Nous avons mesuré pour cette manipulation le pH de la solution de $\text{CH}_3\text{-COOH}$ saturée 5 minutes avec CO_2 . Celui-ci est de 5.

Numéros des manomètres	Résultats (μl de CO_2 dégagés)
1	100
2	96
3	95
4	96,5
5	94
Moyenne	96

Les résultats, meilleurs que ceux des expériences précédentes, sont encore inférieurs au chiffre théorique. Ce qui pourrait laisser supposer un abaissement du titre du $\text{CH}_3\text{-COOH}$. Aussi nous avons recommencé sa détermination à partir d'un standard de CO_2Na_2 desséché à 270° et refroidi sous dessiccateur. Le titre trouvé est toujours de 1,03. Il en résulte que l'acide n'est pas en cause.

Nous avons alors consulté "MANOMETRIC TECHNIQUES" de UMBREIT et ses collaborateurs (103). Un chapitre de cet ouvrage traite de la rétention de CO_2 et indique une correction à effectuer sur les constantes de cuves d'après le pH final du mélange.

On doit déterminer celui-ci au pH mètre et d'après une courbe (Manometric Techniques, p.32, fig.8), chercher le quotient $\frac{\alpha'}{\alpha}$

Connaissant α , on calcule α' et utilise ce dernier coefficient dans le calcul des constantes des cuves.

Munis de cette donnée, nous avons réalisé une expérience dans les conditions suivantes :

- pH du $\text{CH}_3\text{-COOH}$ N/500 saturé 5 minutes avec CO_2 pur : 5,2
 - pH du tampon CO_2HNa : 7
- (réalisé par mélange d'une solution saturée 1 minute avec CO_2 pur et d'une solution non saturée)
- pH final du mélange $\left\{ \begin{array}{l} 2\text{ml } \text{CH}_3\text{-COOH N/500} \\ 0,5\text{ml tampon } \text{CO}_2\text{HNa} \end{array} \right.$ après 20 minutes de contact : 6,2

Numéros des manomètres	Constantes de cuve corrigées	Résultats (μl de CO_2 dégagés)
1	1,44	102
2	1,40	102
3	1,36	102
4	1,47	101,5
5	1,49	102,5
Moyenne		102

La correction réalisée sur les constantes de cuves permet de retrouver le chiffre théorique (102 μl)

Mais on peut se demander si le coefficient de correction varie avec la quantité d'acide qui réagit sur le bicarbonate. Pour résoudre le problème, nous avons recommencé l'expérience précédente avec des quantités de $\text{CH}_3 - \text{COOH}$ N/500 variables : 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 ; 2 ml et en complétant chaque fois le volume à 2 ml avec de l'eau distillée saturée 5 minutes avec CO_2 . La solution de Ringer est la même que pour l'expérience précédente.

$\text{CH}_3 - \text{COOH}$ N/500 ml	H_2O saturée CO_2 ml	Numéros des manomètres	Résultats (μl de CO_2 dégagés et correction pH 6,4)	Théorique (μl CO_2)
0,25	1,75	1	13,5	12,25
		2	15	
0,5	1,5	3	25	25,5
		4	26	
0,75	1,25	5	36	37,75
		6	38	
1	1	7	49,5	51
		8	49	
1,5	0,5	9	76	76,5
		10	75,5	
2	0	11	102	102
		12	103,5	

Ces résultats permettent de conclure que le pH de la solution finale ne varie pas avec la quantité d'acide et que la même correction est applicable à tous les cas. Une réserve doit cependant être faite pour la dose d'acide la plus faible, où le coefficient de correction donne un résultat trop élevé.

4) Conclusion de cette série d'expériences

La détermination du pH des solutions joue un rôle capital. Pour un acide acétique de pH 5 et une solution bicarbonatée saturée par CO_2 , de pH 7, nous obtenons un pH final de 6,2 à 6,4. Il serait donc théoriquement possible en partant de solutions de pH exactement déterminé et en opérant toujours dans les mêmes conditions, de connaître à l'avance la correction à effectuer.

Seulement dans la pratique, nous opérons en présence de globules rouges ou de plasma et il est nécessaire d'étudier leur comportement vis à vis de la réaction acide acétique - bicarbonate.

III - Influence du plasma et des globules rouges sur la rétention de CO_2

Nous avons réalisé la même expérience que précédemment, mais en présence de plasma ou de globules rouges, de façon à déterminer s'ils ont une influence sur la rétention de CO_2 . Le plasma occupant un certain volume dans la fiole, nous sommes amenés à utiliser au départ un acide plus concentré. Mais la teneur finale en acide du mélange reste identique.

1) Expériences réalisées sur du sang humain conservé

La première manipulation a été effectuée avec un plasma humain conservé 3 semaines au réfrigérateur à $+4^\circ$. Son pH est de 8,1. Nous avons utilisé un acide N/250 dilué de façon à obtenir une concentration finale identique à celle obtenue avec l'acide N/500, et nous l'avons employé à deux doses différentes. La solution bicarbonatée est la même que précédemment et elle est toujours utilisée à pH 7.

Plasma pH 8,1 ml	H_2O saturée CO_2 ml	$\text{CH}_3\text{-COOH}$ N/250 ml	Numéros des manomètres	pH final	Résultats (μl de CO_2 dégagés)	Théorique
0,4	0,6	1	1	6,9	27,5	102
			2		28	
-	1	1	3	6,4	100,5	102
0,4	0,85	0,75	4	6,9	21	76,5
			5		25,5	
-	1,25	0,75	6	6,4	76	76,5

Ce plasma brut à pH 8,1 retient donc environ les $\frac{3}{4}$ de la quantité de CO_2 qui devrait théoriquement se dégager.

Il est probable que cette rétention est due à l'alcalinité du plasma utilisé.

Aussi par une saturation avec CO_2 pur pendant 15 secondes, on a pu ramener son pH à 6,8 et réaliser une expérience dans ces conditions.

Plasma pH 6,8 ml	H ₂ O saturée CO ₂ ml	CH ₃ -COOH N/250 ml	Numéros des manomètres	pH final	Résultat (μ l de CO ₂ dégagés) ²	Théorique
0,4	0,6	1	1 2	6,9	36 31	102
-	1	1	3	6,4	103	102
0,4	0,85	0,75	4 5	6,9	28 25,5	76,5
-	1,25	0,75	6	6,4	76,5	76,5

La rétention du CO₂ par le plasma est donc toujours très importante.

Pour l'éviter, nous avons pratiqué une très forte saturation par passage dans le plasma de CO₂ pur pendant 5 minutes.

Au cours de la même manipulation, nous avons réalisé une expérience avec des globules rouges humains conservés également 3 semaines à + 4° et dilués au 1/4. Leur pH est de 7,2. Après 5 minutes de saturation avec CO₂ pur, leur pH est de 6,8.

La solution bicarbonatée saturée de CO₂ a été utilisée à pH 7,2.

Plasma pH 6,8 ml	Globules rouges pH 6,8 ml	H ₂ O saturée CO ₂ ml	CH ₃ -COOH N/250 ml	Numéros des manomètres	pH final	Résultat (μ l de CO ₂ dégagés)	Théorique
0,4	-	0,6	1	1 2	7,2	77,5 74,5	102
-	0,4	0,6	1	3 4	7,2	214 199	
-	-	1	1	5	6,7	101	

Malgré le passage de CO₂ dans le plasma pendant 5 minutes, celui-ci retient encore le quart de la quantité de CO₂ théorique.

D'autre part en présence des globules rouges, le volume de CO₂ dégagé est trop important. Ce qui laisserait supposer qu'ils contiennent des acides susceptibles de réagir sur le bicarbonate.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait une expérience en opérant avec des globules rouges dilués sans mettre d'acide. Nous avons opéré avec une solution bicarbonatée à pH 6,95. Les conditions de pH sont les mêmes que précédemment.

Globules rouges ml	H ₂ O saturée CO ₂ ml	CH ₃ -COOH N/250 ml	Numéros des manomètres	pH final	Résultat (µl de CO ₂ dégagés)	Théorique
0,4	0,6	1	1 2	7,2	225 225,5	
0,4	1,6	-	3 4	7,2	150,5 164	102
-	1	1	5	6,5	101	

Les globules rouges libèrent donc du CO₂ à partir du bicarbonate. Il est possible à partir des chiffres obtenus de calculer la quantité de CO₂ due à la réaction de l'acide sur le bicarbonate.

- Dégagement de CO₂ par les globules rouges
 - " en présence d'acide : 225 µl
 - " sans " : 157 µl
 - " du à l'acide seul : 68 µl

Le chiffre trouvé est bien inférieur à la quantité théorique de 102 µl. Les globules rouges retiennent donc eux aussi du CO₂.

2) Calcul de la rétention d'acide

D'après "Manometric Techniques" (103) il est nécessaire de tenir compte en plus de la rétention de CO₂, d'une rétention d'acide par les globules rouges ou le plasma. Un calcul permet de la déterminer. Le coefficient de rétention Kr est :

$$Kr = \frac{\mu l \text{ CO}_2 \text{ donnés par CH}_3\text{-COOH} + \text{CO}_3\text{HNa}}{\mu l \text{ CO}_2 + \text{globules rouges ou plasma.}}$$

Ce qui donne pour l'expérience précédente :

- pour le plasma : $\frac{75,5}{101} = 0,74$
- pour les globules rouges : $\frac{225}{101} = 2,22$

Le coefficient trouvé est applicable pour un plasma donné ou des globules rouges donnés, si l'on opère toujours sur la même quantité de liquide. Pour calculer le volume de CO₂ dégagé en tenant compte du coefficient, on applique la formule :

$$Ve = \frac{Vr}{Kr} \quad \begin{array}{l} Ve : \text{Volume exact} \\ Vr : \text{Volume de rétention} \end{array}$$

- soit pour le plasma : $\frac{77,5}{0,74} = 104$

et pour les globules rouges : $\frac{214}{2,22} = 96$

Donc en appliquant ce calcul, on trouve pour les expériences précédentes des résultats acceptables. Mais ce processus est compliqué et nous allons voir si avec du sang frais, on ne peut pas s'en libérer.

3) Expérience avec du sang de boeuf frais

Du sang de boeuf a été recueilli à l'abattoir sur oxalate et fluorure. Il a été immédiatement centrifugé 10 minutes à 5.000 tours/mn. Puis le plasma a été séparé et les globules rouges lavés deux fois avec une solution de ClNa à 0,9 %. L'expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, mais sans saturation préalable par CO₂.

Un témoin globules rouges et un témoin plasma sans acide permettent d'étudier leur comportement vis à vis de CO₂.

Globules rouges frais ml	Plasma frais ml	H ₂ O saturée CO ₂ ml	CH ₃ -COOH N/250 ml	Numéros des manomètres	pH final	Résultat (µl de CO ₂ dégagés)	Théorique
0,4	-	0,6	1	1 2	6,5	101,5 104	102
0,4	-	1,6	-	3	6,5	0	
-	0,4	0,6	1	4 5	7,05	32 36,5	
-	0,4	1,6	-	6	6,5	Rétention de CO ₂ équiva- lent à 82 µl	
-	-	1	1	7	6,5	100,5	

Les globules rouges frais de boeuf ne retiennent pas de CO₂, ni d'acide et la réaction bicarbonate-acide acétique produite en leur présence donne un dégagement de CO₂ pratiquement égal au chiffre théorique.

Par contre le plasma, même frais, retient du CO₂ et il s'en suit que les résultats obtenus en présence d'acide sont trop faibles. On pourrait cependant admettre : CO₂ retenu + CO₂ dégagé = CO₂ théoriquement dégagé par l'acide. Ce qui donne :

Numéros des manomètres	Correction pH	CO ₂ retenu	CO ₂ dégagé	Total	
6	6,5	82 µl	21 µl	103 µl	(théorique 102 µl)
4	6,5				

Pour éviter la rétention de CO₂ par le plasma, on le sature avec ce gaz pendant 5 minutes, et en présence d'un antimousse aux silicones * de façon à éviter les pertes de CO₂ dues à la mousse.

* Silicones Rhodorsil Antimousse 426 Rhône-Poulenc

Plasma frais ml	H ₂ O saturée CO ₂ ml	CH ₃ -COOH N/250 ml	Numéros des manomètres	pH final	Résultat (μ l de CO ₂ dégagés) ²	Théorique
0,4	0,6	1	1 2	7,05	86 74	102
0,4	1,6	-	3	6,5	Rétention de CO ₂ équivalent à 35 μ l	

Dans les conditions expérimentales précédentes, il subsiste encore une rétention de CO₂ par le plasma et il faudrait calculer la rétention d'acide de celui-ci.

Nous verrons plus loin au cours de l'exposé des méthodes de dosage des cholinestérases (page 62) une modification du mode opératoire permettant de remédier à cette rétention de CO₂ par le plasma

4) Expérience réalisée sur globules rouges et plasma de boeuf conservés 15 jours au réfrigérateur à + 4° :

La manipulation a été réalisée avec une dose d'acide plus faible (1 ml de CH₃-COOH N/500), devant donner un dégagement gazeux théorique de 51 μ l. Les autres conditions expérimentales sont les mêmes que précédemment :

Globules rouges conservés 15 jours ml	Plasma ml	H ₂ O saturée CO ₂ ml	CH ₃ -COOH N/500 ml	Numéros des manomètres	pH final	Résultat (μ l de CO ₂ dégagés)	Théorique
0,4	-	0,6	1	1 2	7,05	36,5 46	51
	0,4	0,6	1	3 4	7,05	49 47,5	
0,4	-	1,6	-	5	7,05	Rétention CO ₂	
	0,4	1,6	-	6	7,05	"	

Les résultats ont été calculés de la manière suivante, assez artificielle : dénivellation pour CO₂ retenu par les globules rouges ou le plasma seul, diminuée de la dénivellation pour CO₂ retenu par les globules rouges ou le plasma en présence d'acide, égale dénivellation pour CO₂ dégagé.

Les résultats obtenus sont acceptables, quoiqu'un peu faibles, mais la méthode se termine par un calcul assez compliqué.

5) Conclusion de cette série d'expériences.

Seuls des globules rouges et du plasma frais donnent des résultats satisfaisants : excellents pour les globules rouges, un peu moins bons pour le plasma. Il serait alors nécessaire de calculer la rétention d'acide. Tout sang conservé retient du CO_2 et donne de mauvais résultats. Aussi on peut en conclure pour les dosages de cholinestérases, en dehors d'une altération possible de l'enzyme, qu'il est nécessaire d'opérer sur du sang fraîchement prélevé.

IV - Dosages des cholinestérases par la méthode manométrique.

1) Technique générale du dosage des cholinestérases par la méthode manométrique d'AUGUSTINNSON (10)

Le principe général a été exposé page 34.

a) préparation du substrat

On utilise du chlorure d'acétylcholine, de poids moléculaire 181,5 qui est conservé en ampoules scellées, à 200 mg par ampoule. On prépare d'abord une solution stock par dissolution des 200 mg de poudre dans 4 ml de ClH à pH 4, directement dans l'ampoule. Cette manière d'opérer évite une pesée toujours délicate vu les propriétés hygroscopiques du produit. Le substrat utilisé pour la réaction est constitué d'une partie de solution stock et de 4 parties de tampon. Si la solution stock est utilisable quelques jours en la conservant à + 4°, le substrat dilué doit être préparé immédiatement avant chaque réaction.

b) solution tampon

On utilise le tampon de Ringer bicarbonaté adopté par AUGUSTINNSON :

- 100 ml de Cl Na à 0,9%
- 30 ml de CO_3 HNa à 1,26%
- 2 ml de Cl_2 Mg, 6 H₂O à 1,76%

Cette solution est utilisable 2 à 3 jours si elle est conservée à + 4°. Elle doit avant chaque manipulation être saturée pendant 1 minute avec CO_2 pur. Une saturation plus longue abaisserait trop le pH du tampon, ce qui risquerait de nuire à l'activité enzymatique.

c) mode opératoire

On met dans le compartiment central des fioles de WARBURG :

- 0,1 ml de sang, plasma ou globules rouges frais.
- 2,5 ml de tampon bicarbonaté saturé de CO_2

Dans le bras latéral, on introduit 0,4 ml de la solution diluée de chlorure d'acétylcholine.

Les fioles sont reliées aux manomètres et l'ensemble est porté au bain-marie à 25°. Après passage du mélange gazeux dans l'atmosphère des fioles et équilibre des températures, on verse le substrat dans la solution enzymatique. La réaction n'étant pas instantanée, il suffit de pratiquer une lecture toutes les 10 minutes jusqu'à 40 minutes. Le résultat trouvé est exprimé en μl de CO_2 dégagés en 30 minutes par la prise d'essai de solution.

La technique originale d'AUGUSTINNSON donnait un temps de passage de mélange gazeux dans les manomètres de 5 minutes. Nous avons réduit ce délai à 2 minutes pour limiter la consommation de gaz.

2) Dosage des cholinestérases du sang de boeuf par la méthode manométrique.

Le dosage a été réalisé sur du sang de boeuf frais prélevé à l'abattoir sur oxalate et fluorure, et sur les globules rouges et le plasma séparés par centrifugation. Les globules rouges sont utilisés après deux lavages à l'eau physiologique.

Tampon ml	Globules rouges ml	Plasma ml	Sang ml	Substrat ml		Résultat en μ l de CO_2 en 30 minutes
2,5	0,1	-	-	0,4		242
2,5	-	0,1	-	0,4		2,5
2,5	-	-	0,1	0,4		164
2,6	-	-	-	0,4	Témoin substrat	0
2,5	0,1	-	-	-	" globules rouges	0
2,5	-	0,1	-	-	" plasma	0
2,5	-	-	0,1	-	" sang	0

Le mélange du tampon bicarbonaté et de la solution enzymatique n'entraîne donc aucun dégagement de CO_2 . Il ne sera donc pas utile de refaire ces témoins pour chaque expérience. On n'a pas observé d'hydrolyse spontanée du substrat. Le taux de cholinestérase plasmatique est ici extrêmement faible, ce qui confirme les données de la littérature.

3) Essai de la technique des taches sur papier filtre .

AUGUSTINSON (9,11) avait préconisé une méthode de dosage des cholinestérases dans le sang total en déposant une quantité exactement mesurée de sang sur un petit carré de papier filtre. On laisse sécher et au moment de l'emploi, on découpe la tache de sang. Les morceaux sont introduits avec une pince dans le compartiment central des fioles et on ajoute la solution tampon. Celle-ci dissout le sang sec et le dosage se termine selon la technique classique.

La méthode présente l'avantage de pouvoir opérer avec une quantité de sang très faible. Une simple piqûre au doigt avec un vaccinostyle serait suffisante. D'autre part le transport de l'échantillon au laboratoire serait grandement facilité, car les taches de sang se conservent à la température ordinaire.

En plus du sang total, nous avons réalisé cette technique sur globules rouges et plasma.

Le même jour que l'expérience précédente, on dépose sur des carrés de papier filtre :

- 0,05 ml de globules rouges - 0,05 ml de sang total

- 0,1 ml de " " - 0,1 ml de "

de façon à obtenir une tache de 2 à 3 cm de diamètre. On laisse sécher 30 minutes en posant les carrés de papier filtre sur des verres de montre de façon à éviter le contact de la tache humide avec la pailleasse. On abandonne le tout une nuit. Le lendemain, on réalise le dosage.

On découpe alors en morceaux les taches en recueillant les fragments dans un verre de montre. On remarque que le découpage des taches de globules rouges laisse échapper de petites écailles. Celles qui sont tombées dans le verre de montre ont été récupérées à l'aide de la solution tampon. Les morceaux sont introduits dans le compartiment central des fioles et on ajoute 2,6 ml de tampon bicarbonaté. Après agitation, on laisse reposer un instant afin d'assurer la dissolution. Le dosage est réalisé selon la technique classique.

Tampon ml	Taches de	Substrat ml	Résultat en $\mu\text{l CO}_2$ en 30 minutes
2,6	0,05 ml globules rouges	0,4	108
2,6	0,1 ml "	0,4	189
2,6	0,05 ml sang	0,4	75
2,6	0,1 ml "	0,4	156
2,6	-	0,4	-

Une comparaison avec l'expérience précédente nous montre que l'activité cholinestérasique du sang total est pratiquement identique pour les deux méthodes. Il n'en est malheureusement pas de même pour les globules rouges où l'activité de la tache desséchée est nettement plus faible que celle des globules rouges prélevés directement. Ce qui provient du fait que les écailles de globules rouges n'ont certainement pas toutes été récupérées. Aussi il convient de recommencer la méthode en la confrontant avec la technique par pipetage direct. L'expérience sera réalisée uniquement sur les globules rouges.

Tampon ml	Prise d'essai de globules rouges	Substrat ml	Résultat ($\mu\text{l CO}_2$ en 30 minutes)
2,6	Tache 0,05 ml		121,5
2,6	Tache 0,1 ml		205
2,6	0,05 ml	0,4	124,5
2,6	0,1 ml		235,5
2,6			-

Avant le découpage, les taches de globules rouges sont légèrement humidifiées par la solution tampon bicarbonatée. Les résultats montrent qu'à la dose de 0,05 ml, les pertes sont très faibles. Elles sont beaucoup plus importantes pour la dose de 0,1 ml. En effet la tache correspondante est épaisse et l'humidification colle les globules rouges au ciseau au moment du découpage.

Néanmoins les résultats sont meilleurs que selon la technique précédente.

4) Dosage des cholinestérasases sur du sang humain, direct et sur taches sur papier filtre.

Le sang utilisé provient des ingénieurs des Usines Rhône-Poulenc qui travaillent à la fabrication des composés organophosphorés et pour lesquels des dosages de cholinestérasases sont pratiqués à intervalles réguliers. Ce sang est prélevé sur héparine.

Les dosages ont été réalisés sur globules rouges, plasma et sang total, selon les deux techniques. Vu la longueur des manipulations, celles-ci ont été étalées sur plusieurs jours et selon les résultats obtenus, le mode opératoire a été modifié au cours de la série d'expériences. Nous avons adopté comme prise d'essai la dose de 0,05 ml de solution enzymatique. Les dégagements gazeux sont alors moins importants et les risques de perte moins grands.

5 échantillons de sang ont été analysés. Les sangs 1 et 2 ont été dosés selon la technique précédente : humidification des taches de globules rouges, simple passage du mélange gazeux dans les manomètres. Le taux d'enzyme plasmatique s'est révélé trop faible et les écarts entre les deux méthodes trop grands pour les globules rouges. Aussi nous avons apporté deux modifications importantes.

a) pour éviter l'adhérence des globules rouges au ciseau due à l'humidification du papier, les taches ont été étalées sur une plus grande surface en soufflant sur la goutte. Ce qui permet de couper le papier filtre à sec et sans projection d'écailles. Les sangs 3, 4 et 5 ont été analysés selon cette technique.

b) les taux de cholinestérases plasmatiques obtenus sont probablement dus à une rétention de CO_2 par le plasma. Aussi nous avons réalisé dans la solution enzymatique une saturation supplémentaire de 20 secondes avec le mélange gazeux N_2/CO_2 . Après un repos au bain-marie à 25° les robinets étant fermés, le mélange gazeux est passé dans les manomètres pendant 1 minute 15 secondes. Puis on laisse subsister une légère surpression dans le manomètre en fermant le bouchon purgeur avant l'arrivée de gaz. Cette surpression sera éliminée au bout de 5 minutes d'équilibre par ouverture mesurée du bouchon purgeur.

La technique permet d'assurer une saturation maximum en CO_2 , aussi bien du liquide que de l'atmosphère gazeuse du manomètre. Les plasmas 1 et 2, et les sangs 3, 4 et 5 en totalité ont été analysés selon cette technique qui nous a donné toute satisfaction et sera adoptée pour les déterminations ultérieures.

Ces remarques étant faites, nous allons regrouper les résultats obtenus dans un tableau :

Prise d'essai : 0,05 ml

Substrat : 0,4 ml

Résultats exprimés en $\mu\text{l CO}_2$ en 30 minutes dans 0,05 ml de globules rouges, plasma ou sang total.

Sangs humains		1	2	3	4	5
Expériences réalisées le		18-1-65	19-1-65	20-1-65	21-1-65	22-1-65
Hématocrite %		47,5	45	48,5	52,5	54,5
Taches	Plasma	59,5	61,5	19,5	59	44,5
	Globules rouges	105	113	130	151,5	155
	Sang total	89	92,5	86	129	121
Pipetage direct	Plasma	68,5	83,5	23	63	48
	Globules rouges	158	163	160,5	195	182
	Sang total	111	120,5	102	133	131

Nous remarquerons que le plasma N° 5 a un taux d'enzyme plasmatique abaissé, et le N° 3 un taux très faible.

Malgré les modifications de la technique, le résultat obtenu sur papier est toujours plus faible que par pipetage direct. L'écart est peu important pour le plasma. Pour les globules rouges, il s'élève à environ 20 %.

AUGUSTINSON (9) effectuait le dosage sur le sang total et à partir de l'hématocrite calculait la quantité de cholinestérase globulaire et plasmatique. Nous avons réalisé ce calcul et obtenons les résultats suivants, exprimés en μl de CO_2 pour 0,05 ml de sang.

Sangs humains	1	2	3	4	5
Tache plasma	31	34	10	28	20,5
" globules rouges	50	51	64	79,5	84,5
" plasma + globules rouges	81	85	74	107,5	105
Direct plasma	36	46	12	30	22,5
" globules rouges	75	74	78	102,5	99
" plasma + globules rouges	111	120	90	132,5	121,5

La somme enzyme plasmatique + globulaire calculée à partir de l'hématocrite devrait être identique théoriquement au taux de cholinestérase du sang total. Or pour la technique des taches, il y a toujours un écart. Celui-ci est plus faible pour la méthode par pipetage direct, sauf dans le cas de l'enzyme plasmatique à taux abaissé.

Il est possible que le papier filtre retienne une partie de l'enzyme, ce qui expliquerait des résultats inférieurs à ceux de la méthode directe. Aussi nous avons essayé de réaliser des taches sur papier WHATMAN (11) et sur papier de verre, d'après la même technique que précédemment. L'expérience, limitée aux globules rouges, a donné les résultats suivants, toujours exprimés en μl CO_2 en 30 minutes pour la prise d'essai de 0,05 ml.

Globules rouges	1	2
Papier Whatman	134	142
Papier de verre	111	129
Pipetage direct	151,5	154

Ce dosage a été réalisé sur les sangs humains précédents conservés une semaine à + 4°. On peut constater un léger abaissement du taux de cholinestérase globulaire, inférieur à 10 %.

Le papier qui retient le moins l'enzyme est le Whatman. Le papier de verre par contre retient encore assez fortement l'enzyme quoiqu'un peu moins que le papier filtre ordinaire.

5) Expérience à 37° sur sang desséché

Les essais précédents ne nous ayant pas donné satisfaction, nous avons pratiqué une nouvelle série de déterminations sur sang sec, mais en apportant les modi-

fications suivantes :

- la prise d'essai de globules rouges a été réduite à 0,03 ml. L'étalement de la tache, réalisé sur papier WHATMAN, est alors plus facile et peut se faire directement avec la pointe de la pipette.
- au lieu de laisser la tache de globules rouges au repos pendant une nuit, le dosage a été réalisé 3 heures après le prélèvement.
- la détermination au manomètre de WARBURG a été effectuée à 37°.

Les déterminations, pratiquées sur sang humain, donnent les résultats suivants:

Globules rouges N°	Sang sec	Sang liquide
	µl de CO ₂ dégagés en 30 mn. pour 0,03 ml de prise d'essai	
1	176,5	184
2	189,5	192
3	139,5	147

La différence entre les deux déterminations est faible (moins de 5 %). Aussi l'on pourrait penser que la technique sur sang sec serait valable, à condition de réaliser le dosage le plus tôt possible après la dessiccation de la tache de globules. Par la suite, une partie de la cholinestérase s'inactiverait.

Mais le nombre de sang testés ayant paru insuffisant, nous avons ultérieurement réalisé un nouvel essai dans les mêmes conditions et également sur sang humain. Nous obtenons les résultats suivants :

Globules rouges N°	Sang sec	Sang liquide
	µl de CO ₂ dégagés en 30 mn. pour 0,03 ml de prise d'essai	
4	135	165,5
5	114,5	148,5
6	158,5	188,5

Malheureusement ces chiffres ne confirment pas les résultats précédents et l'écart entre les deux déterminations dépasse 20 %.

6) Conclusions

Il n'est donc pas possible de conclure à la validité de la technique sur sang sec appliquée à la détermination de la cholinestérase globulaire. Les résultats sont toujours plus faibles que sur sang liquide. Ce qui montrerait, soit une rétention des cholinestérases sur le papier qui sert de support, soit une inactivation de celles-ci par dessiccation et peut-être par contact prolongé à l'air.

La méthode d'AUGUSTINSON (9) où l'on calcule le taux d'enzyme globulaire et plasmatique à partir du sang total en tenant compte de l'hématocrite ne semble pas donner de bons résultats si on la compare à la technique par pipetage direct. Il est préférable dans la mesure du possible de séparer le plasma et les globules et de réaliser le dosage sur chacune des fractions.

V. Etude de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique du chlorure d'acétylcholine réalisée au manomètre de WARBURG selon la méthode d'AUGUSTINNSON.

Cette étude de cinétique a été réalisée de manière détaillée par WITTER (110) sur du sang de rat par méthode manométrique. L'auteur a montré que la représentation graphique de la cinétique d'hydrolyse enzymatique effectuée à 37° était une droite jusqu'à une quantité de 0,2 ml de globules rouges.

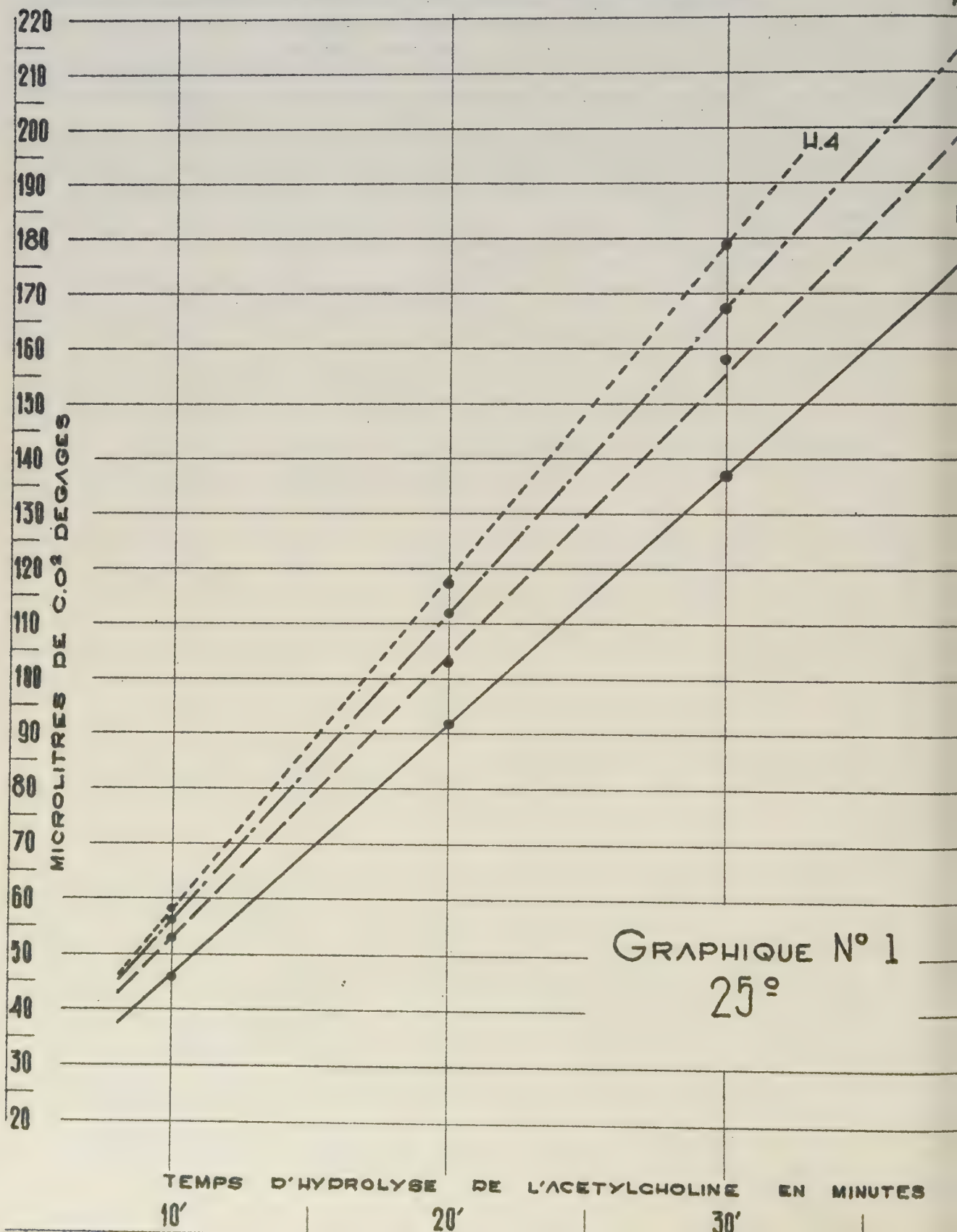
Nous nous proposons de regrouper les résultats que nous avons obtenus au cours de diverses déterminations des cholinestérases globulaires à l'appareil de WARBURG, selon la méthode d'AUGUSTINNSON et de les reporter sur un graphique.

En abscisses, nous indiquerons le temps d'hydrolyse du chlorure d'acétylcholine en minutes et en ordonnées le nombre de microlitres de CO_2 dégagés. Rappelons que tous les résultats, par le jeu des constantes de cuves sont ramenés à 0° et 760 mm de mercure (103)

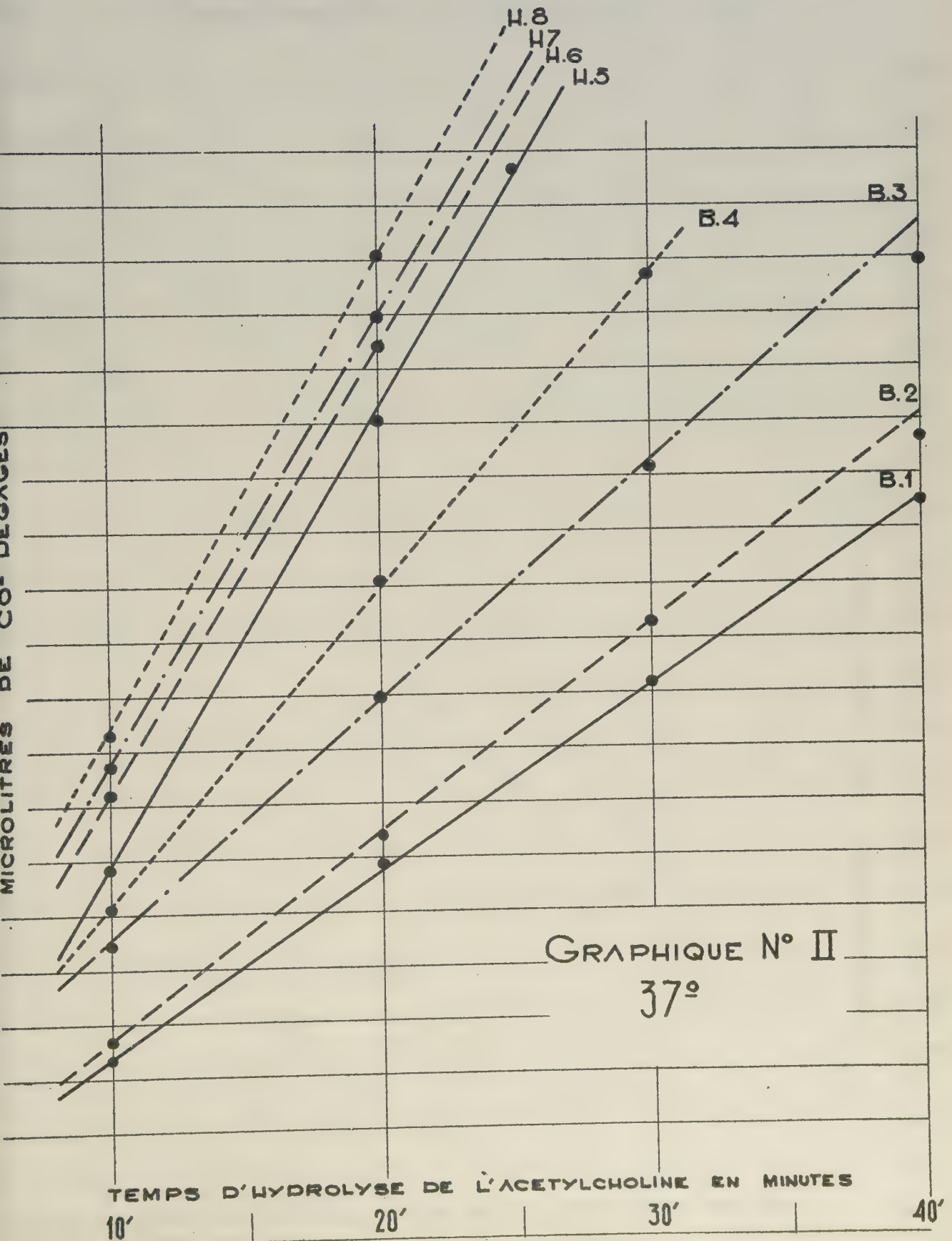
Nos dosages de cholinestérases ayant été réalisés tantôt à 25°, tantôt à 37°, nous obtiendrons deux séries de courbes.

Les résultats sont portés sur les deux graphiques qui suivent (graphiques I et II)

COURBES DE CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DU CHLORURE D'ACETYLCHOLINE
 REALISEE AU MANOMETRE DE WARBURG A 25° (METHODE D'AUGUSTINNS
 CHOLINESTERASES GLOBULAIRES (Sangs Humains)
 PRISE D'ESSAI: 0,05 ml. de Globules Rouges

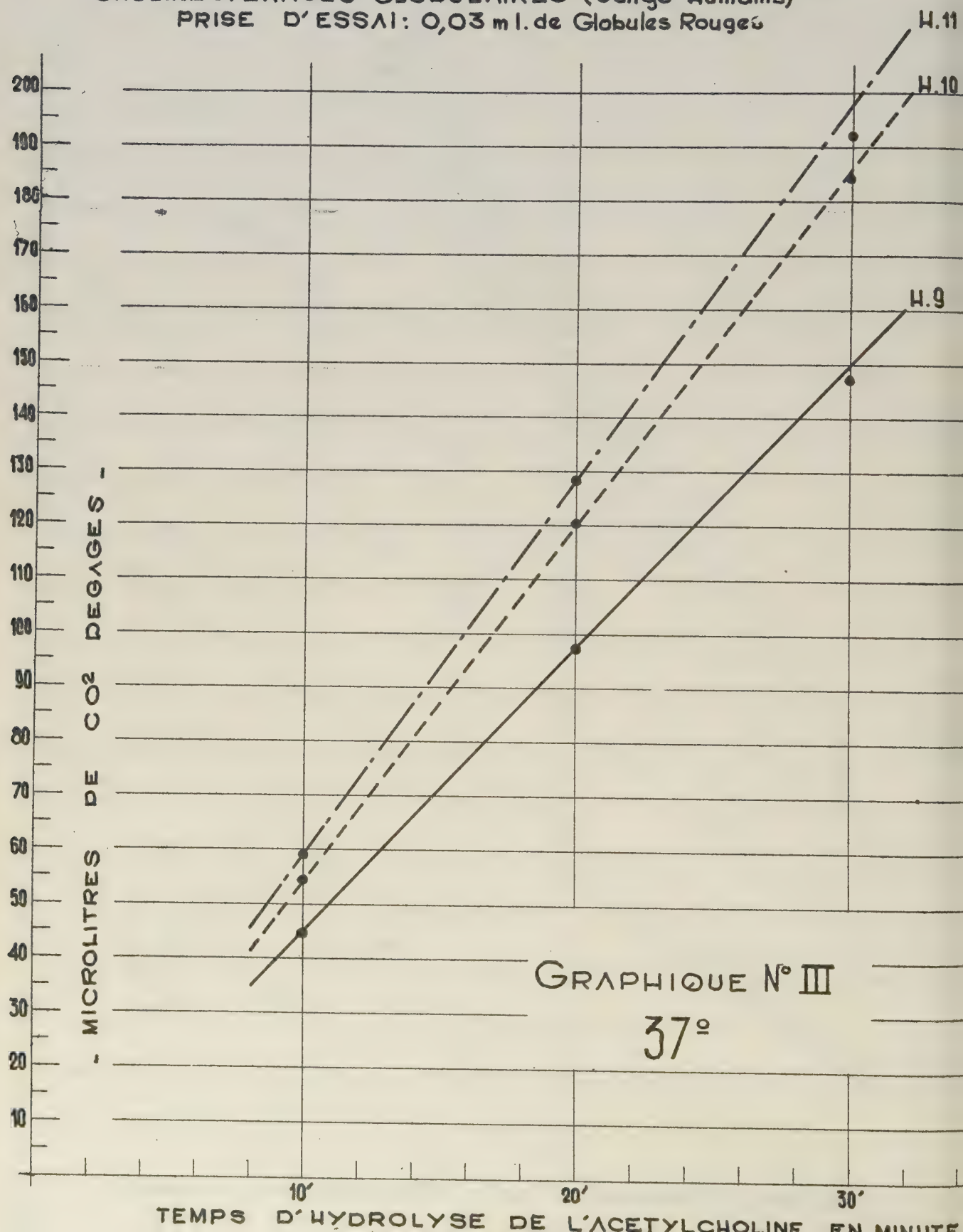


CURVES DE CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DU CHLORURE D'ACETYLCHOLINE
MESUREE AU MANOMETRE DE WARBURG A 37° (METHODE D'AUGUSTINSON)
CHOLINESTERASES GLOBULAIRES (H. homme. B. boeuf)
PRISE D'ESSAI: 0,05 ml. de Globules Rouges



- 68 -

COURBES DE CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DU CHLORURE D'ACETYCHOL
 REALISEE AU MANOMETRE DE WARBURG A 37° (METHODE D'AUGUSTINNS
 CHOLINESTERASES GLOBULAIRES (Sangs Humains)
 PRISE D'ESSAI: 0,03 ml. de Globules Rouges



Nous en tirerons les conclusions suivantes :

1.-

a) les points obtenus par lectures échelonnées au manomètre de WARBURG toutes les 10 minutes sont alignés sur une droite, au moins pendant 30 minutes.

b) en effet le point correspondant à 40 minutes d'hydrolyse s'écarte un peu de la droite que nous avons tracée, surtout pour une activité enzymatique assez élevée et à 37°. Ce point est légèrement en dessous de la droite, ce qui montrerait un léger ralentissement de l'activité enzymatique au delà de 30 minutes.

c) pour la prise d'essai de 0,05 ml adoptée, et pour une forte activité cholinestérasiq, il n'a pas été possible de déterminer le point correspondant à 30 minutes d'hydrolyse pour des globules rouges humains à 37°, vu la capacité limitée du manomètre de WARBURG.

Aussi il nous a paru intéressant de réduire la prise d'essai de globules rouges humains à 0,03 ml. Dans ces conditions, le point correspondant à 30 minutes d'hydrolyse enzymatique peut être obtenu. (Graphique III)

Le graphique pour 0,03 ml de globules rouges humains montre que le point "30 minutes" est légèrement inférieur à la droite théorique.

Mais la différence est faible et ne remet pas en cause la proportionnalité entre le temps et le nombre de μ l de CO_2 dégagés.

Aussi, ce fait nous autorise à calculer l'activité enzymatique en 30 minutes à partir d'un chiffre déterminé pour un temps plus court. Cette constatation est intéressante, car elle permet de mesurer l'activité enzymatique de 0,05 ml de globules rouges, et si elle est élevée, de pouvoir exprimer le résultat pour 30 minutes d'hydrolyse enzymatique.

2.- La vitesse d'hydrolyse de chlorure d'acétylcholine par les cholinestérases globulaires humaines est beaucoup plus élevée à 37° qu'à 25° (graphiques I et II)

3.- A température égale, cette vitesse d'hydrolyse est plus grande chez l'homme que chez le boeuf (graphique II)

VI.- Rappel de la technique manométrique d'AUGUSTINSON (10) telle que nous l'avons adaptée.

On met dans le compartiment central des fioles de WARBURG :

- 2,55 ml de tampon de Ringer bicarbonaté (la composition est indiquée page 50), saturé 1 minute avec CO_2 pur.

- 0,05 ml de globules rouges ou de plasma.

- une fiole qui servira de témoin substrat et de thermobaromètre reçoit 2,6 ml du tampon précédemment préparé.

Puis on dilue le substrat de la manière suivante (pour 10 dosages)

- 1 ml de solution-mère de chlorure d'acétylcholine à 5 %

- 4 ml de tampon bicarbonaté saturé de CO_2 .

On réalise ensuite dans la solution de globules rouges ou de plasma diluée par le tampon un barbotage de 20 secondes avec le mélange 95% N_2 / 5% CO_2 . Aussitôt après, on ajoute dans le bras latéral de la fiole 0,4 ml de substrat.

On monte immédiatement les fioles sur les manomètres. En même temps on ferme les robinets. On porte aussitôt le tout au bain-marie à 37° dans l'appareil de WARBURG. Les surpressions sont éliminées avec le bouchon purgeur.

Puis après avoir ouvert de nouveau les robinets, on fait passer dans chaque manomètre le mélange gazeux N_2/CO_2 pendant 1 mn. 15 sec. Par un jeu approprié des robinets, on laisse subsister une légère surpression (branche gauche du manomètre entre 17 et 18). On déclanche le dispositif d'agitation qu'on laisse fonctionner 15 à 20 minutes afin de réaliser l'équilibre des températures. Toutes les 5 minutes

on élimine les surpressions éventuellement observées par le jeu du bouchon purgeur.

Après lecture préalable sur les manomètres (voir page 49), on mélange substrat et enzyme. Puis toutes les 10 minutes on lit la dénivellation sur la branche gauche du manomètre après avoir ramené la branche droite à 15.

Le principe du calcul a été exposé page 49 . Les constantes de cuves seront calculées pour 3 ml de liquide (V_f) et les résultats exprimés en microlitres de CO_2 dégagés en 30 minutes pour 0,05 ml de prise d'essai.

B) Expériences basées sur la détermination colorimétrique selon la réaction de HESTRIN, de l'acétylcholine qui n'a pas réagi.

Le principe de cette réaction a été exposé plus haut au cours des méthodes générales de dosages des cholinestérases. (voir page 35) Les adaptations de la réaction de HESTRIN sont nombreuses et nous étudierons les protocoles expérimentaux proposés par H. GUYOT (51), D. VINCENT et G. SEGONZAC (106), R. TRUHAUT et H. VERNIN (102) inspirée de la méthode de FLEISHER et POPE (42), W.E. ROBBINS et ses collaborateurs (90), S. CHARONNAT et ses collaborateurs (22). Les résultats de ces techniques colorimétriques seront comparées à ceux de la méthode manométrique d'AUGUSTINSON qui nous servira de référence.

Un paragraphe spécial sera réservé à une modification de la méthode de D. VINCENT et G. SEGONZAC (107), publiée en avril 1965 et qui utilise le Diparcol comme inhibiteur sélectif de la cholinestérase du plasma.

Nous décrirons les différents modes opératoires proposés par les auteurs. Puis nous doserons les cholinestérases de divers échantillons de sang par la technique manométrique et par colorimétrie. Par comparaison des résultats obtenus, nous sélectionnerons les protocoles expérimentaux dont les chiffres se rapprochent le plus de ceux donnés par méthode manométrique.

I) Description des techniques de H. GUYOT, D. VINCENT et G. SEGONZAC, R. TRUHAUT, W.E. ROBBINS et S. CHARONNAT.

Première partie : Mise en route de la réaction d'hydrolyse

Après hémolyse préalable s'il y a lieu, on dilue la prise d'essai de solution de globules rouges, plasma ou sang total, dans un tampon approprié. D'autre part, on prépare le substrat : solution de chlorure d'acétylcholine à concentration connue et optimale. On mélange enzyme et substrat, puis on porte au bain-marie à la température convenable. On laisse l'hydrolyse se réaliser pendant le temps indiqué.

Nous donnerons la composition des réactifs et quelques détails opératoires. Puis dans un tableau, nous indiquerons le protocole expérimental de toutes les techniques utilisées, y compris celle de D. VINCENT et G. SEGONZAC sur sang total, que nous détaillerons plus loin. (page 81).

1) Les auteurs ont proposé selon les cas comme solution enzymatique le sang total, les globules rouges ou le sérum. Nous avons essayé chaque méthode à la fois sur le sang total et sur ses fractions.

La prise d'essai doit être mesurée avec une pipette précise et à écoulement total de façon à permettre un rinçage au moyen de la solution tampon.

2) Dans toutes les techniques, on réalise en même temps que la réaction enzymatique :

a) un témoin substrat avec :

- 1 ml de tampon
- 1 ml de substrat

b) un témoin réactif avec :

- 2 ml de tampon

3) composition des solutions tampons

a) tampon véronal à pH 7,4 (H. GUYOT, D. VINCENT et G. SEGONZAC, R. TRUHAUT)

Véronal sodique à 20,6 g/l : 5 ml

Véronal à 3,67 g/l : 95 ml

La solution de véronal est préparée à chaud au bain-marie. La dissolution totale exige une agitation prolongée (5 à 10 minutes).

b) tampon phosphate à pH 7,2 (W.E. ROBBINS)

$\text{PO}_4 \text{HNa}_2$, 2 H_2O à 23,752 g/l : 7 volumes

$\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$ à 18,156 g/l : 3 volumes

Les phosphates peu solubles à froid se dissolvent presque instantanément dans l'eau chaude.

c) tampon véronal sodique acétique à pH 8,6 (S. CHARONNAT)

$\text{CH}_3\text{-COONa}$	3,238 g
Véronal sodique	4,904 g
Cl H O , 1 N	24 ml
H_2O	q.s.p. 500 ml

Ces solutions tampon se conservent mal et ne sont utilisables que pendant 2 à 3 jours.

4) La prise d'essai de solution enzymatique est diluée dans le tampon, directement ou après hémolyse préalable dans l'eau distillée. Dans tous les cas, on agite pour laquer le sang ou les globules rouges. Cependant dans la technique de W.E. ROBBINS, l'hémolyse est réalisée dans une solution de saponine à 0,01 %. La réaction est effectuée dans des tubes à essais, sauf dans la méthode de S. CHARONNAT qui utilise des tubes à centrifuger.

5) Pour obtenir la concentration voulue, le substrat est toujours dilué au moment de l'emploi dans le tampon. On se sert de la même solution stock que dans la technique manométrique. La concentration proposée par R. TRUHAUT et par W.E. ROBBINS est de 4 $\mu\text{moles/ml}$. Nous avons préféré utiliser un substrat à 0,75 % ce qui correspond à 4,13 μmoles par ml. Il suffit de tenir compte de cette donnée dans les calculs.

6) H. GUYOT et D. VINCENT opèrent à 38°. Nous avons ramené la température de l'expérience à 37° afin de pouvoir effectuer la comparaison avec la technique manométrique. R. TRUHAUT est le seul auteur à préconiser la température de 25°. Nous avons réalisé également les méthodes de S. CHARONNAT et de W.E. ROBBINS à 25°.

7) Nous avons initialement respecté les temps d'incubation indiqués par les auteurs. Cependant nous avons été amenés ultérieurement pour toutes les expériences, selon la technique de W.E. ROBBINS, à laisser l'hydrolyse se réaliser pendant 30 minutes. Si l'on s'attend à un taux de cholinestérase élevé, il est nécessaire d'utiliser alors un substrat plus concentré à 8,26 ou 12,39 μmoles par ml.

Deuxième partie : Réalisation de la réaction colorée

Une fois le temps d'hydrolyse enzymatique écoulé, on stoppe la réaction avec un réactif approprié, qui dans certaines techniques a aussi pour but de faire flocculer les protéines. Dans ce cas, on centrifuge et prélève le surnageant. On transforme ensuite l'acétylcholine restante en acétylhydroxamate alcalin par addition d'une solution alcaline d'hydroxylamine.

Après un temps de repos, on passe en milieu acide et on réalise la réaction colorée par addition de perchlorure de fer. Si l'acidification précédente est insuffisante pour précipiter les protéines, il est nécessaire d'ajouter à la fin un réactif approprié, variable selon les méthodes. On termine par une filtration, et on effectue les lectures.

Il est nécessaire d'insister sur le fait que les solutions colorées terminales

doivent être d'une absolue limpidité. Nous avons pu constater au cours de notre travail que si cette condition n'était pas respectée, les erreurs se révélaient très importantes.

Nous exposerons les réactifs et appareils utilisés. Puis nous détaillerons le mode opératoire de chaque auteur dans un tableau.

1) Le réactif "hydroxylamine alcaline" se prépare à partir d'une solution d'hydroxylamine :

- chlorhydrate d'hydroxylamine : 27,8 g
- H_2O : 200 ml

que l'on dilue dans les proportions suivantes :

	<u>W.E. ROBBINS</u>	<u>Autres techniques</u>
Solution d'hydroxylamine	1 volume	1 volume
Na OH 3,5 N	1 volume	2 volumes
La solution mère d'hydroxylamine ne se conserve que 15 jours à + 4°.		
2) Dans toutes les techniques, la solution de $Cl_3 Fe$ est réalisée comme suit :		
	$Cl_3 Fe, 6 H_2 O$	10 g
	$Cl H O, 1 N$	100 ml

3) Il convient de bien agiter les tubes après addition de chaque réactif.

4) Le blocage de la réaction enzymatique est effectué par de l'acide chlorhydrique N par H. GUYOT et D. VINCENT. Pour R. TRUHAUT et pour W.E. ROBBINS, l'alcalinité de la solution d'hydroxylamine est suffisante pour détruire l'enzyme. La réaction a été stoppée par S. CHARONNAT à l'aide d'acide trichloracétique. Celui-ci précipite en même temps les protéines du sang et l'on s'en débarrasse par centrifugation. Le même réactif est utilisé par H. GUYOT dans ce but, mais après avoir effectué la réaction colorée. R. TRUHAUT emploie de l'acide perchlorique. Pour W.E. ROBBINS, la forte quantité de ClH 4N utilisée suffit à faire flocculer les protéines.

5) Toutes les déterminations colorimétriques ont été réalisées au spectrophomètre JOBIN et YVON dans des cuves en verre. On règle le zéro de l'appareil sur le témoin réactif. Puis on effectue les lectures en densités optiques (D.O.)

Première partie - Mise en route de la réaction d'hydrolyse

- 74 -

Méthodes	Prise d'essai	H ₂ O	Nature du tampon	Quantité de tampon	Diparcol 0,04 %	Solution de substrat Concentration	Température bain-marie	Temps incubation	Acide trichloracétique 40 %
H. GUYOT (51)	0,05 ml globules rouges	0,15 ml Agiter	Véronal pH 7,4	0,80 ml		1°/∞	37° (technique originale 38°)	10 mn	
D. VINCENT et G. SEGONZAC sur sérum (106)	1 ml de sérum dilué au 1/20 dans tampon		Véronal pH 7,4	0,95 ml		1°/∞	37° (technique originale 38°)	30 mn	
R. TRUHAUT (102)	0,05 ml sang total		Véronal pH 7,4	0,95 ml		0,75°/∞ 4,13 μmoles Technique originale 4 μmoles	25°	10 mn	
W.E. ROBBINS (90)	0,05 ml sang de boeuf		Phosphate pH 7,2	0,95 ml solution saponine à 0,01 %		0,75°/∞ 4,13 μmoles Technique originale 4 μmoles	37°	10 mn	
S. CHARONNAT (22)	0,05 ml sang total (technique originale) 0,04 ml)	0,5 ml	Véronal sodique acétique pH 8,6	0,50 ml		2°/∞ (substrat original acétyl β méthylcholine)	37°	30 mn	0,2 ml centrifuge prélève 1 ml
D. VINCENT et G. SEGONZAC sur sang total sans Diparcol avec Diparcol (107)	0,2 ml sang total dilué au 1/10 H ₂ O		Véronal pH 7,4	0,80 ml	0	1°/∞	37° (technique originale) 38°	30 mn	A. Trichlo. 10% 1 ml centrifuge prélève 1,5 ml
			-d°-	0,70 ml	0,1 ml	-d°-	-d°-	-d°-	-d°-

Deuxième Partie : Réalisation de la réaction colorée

- 75 -

Méthodes	Cl H N	Solution d'hydroxylamine alcaline	Attente	Cl H 4 N	H ₂ O	ClO ₄ H 1,8 M	Cl ₃ Fe	Acide Trichloracétique 5 %	H ₂ O		Lecture colorimétrique
H. GUYOT	0,2 ml	0,4 ml	1 mn	0,2 ml			0,2 ml	4 ml		Attendre quelques minutes Filter	530 mμ
D. VINCENT & G. SEGONZAC sur sérum	0,2 ml	0,4 ml	Agiter	0,2 ml			0,2 ml		4 ml		520 mμ
R. TRUHAUT		0,4 ml rapidement	2 mn		2 ml	0,4 ml	0,2 ml			Filter	Attendre 15 mn après Cl ₃ Fe 520 mμ
W.E. ROBBINS		4 ml formule spéciale	2 mn	2 ml			2 ml			Filter	Attendre 10 mn après Cl ₃ Fe 540 mμ
S. CHARONNAT		0,2 ml	Agiter	0,1 ml			0,1 ml		2 ml		540 mμ
D. VINCENT & G. SEGONZAC sur Sang total avec ou sans Diparcol		0,4 ml	Agiter	0,3 ml			0,2 ml		2 ml		540 mμ

Troisième partie : Calcul des résultats

Dans toutes les méthodes, sauf celle de W.E. ROBBINS, on calcule d'abord le nombre de mg d'acétylcholine qui ont été hydrolysés, selon la formule :

$$\frac{\text{D.O. témoin} - \text{D.O. réaction}}{\text{D.O. témoin}} = \frac{\text{nombre de mg d'acétylcholine hydrolysés pour la prise d'essai et le temps d'incubation utilisé.}}{\text{D.O. témoin}}$$

En effet la densité optique de la réaction colorée représente l'acétylcholine qui n'a pas été hydrolysée.

On n'exprime pas d'ordinaire le résultat en mg mais en μ moles d'acétylcholine hydrolysées. Pour cela, il faut utiliser la formule :

(181,5 étant la masse moléculaire du chlorure d'acétylcholine

$$\frac{x \text{ mg} \times 1000}{181,5} = x \text{ } \mu \text{ moles d'acétylcholine hydrolysées.}$$

Si le temps d'incubation proposé par l'auteur est de 10 minutes, on ramène par le calcul le résultat obtenu en μ moles d'acétylcholine hydrolysées en 30 minutes, afin de pouvoir effectuer la comparaison avec la technique manométrique.

Le principe de calcul de la méthode de W.E. ROBBINS est différent. On a au préalable réalisé une courbe d'étalonnage en effectuant la réaction sur les dilutions suivantes :

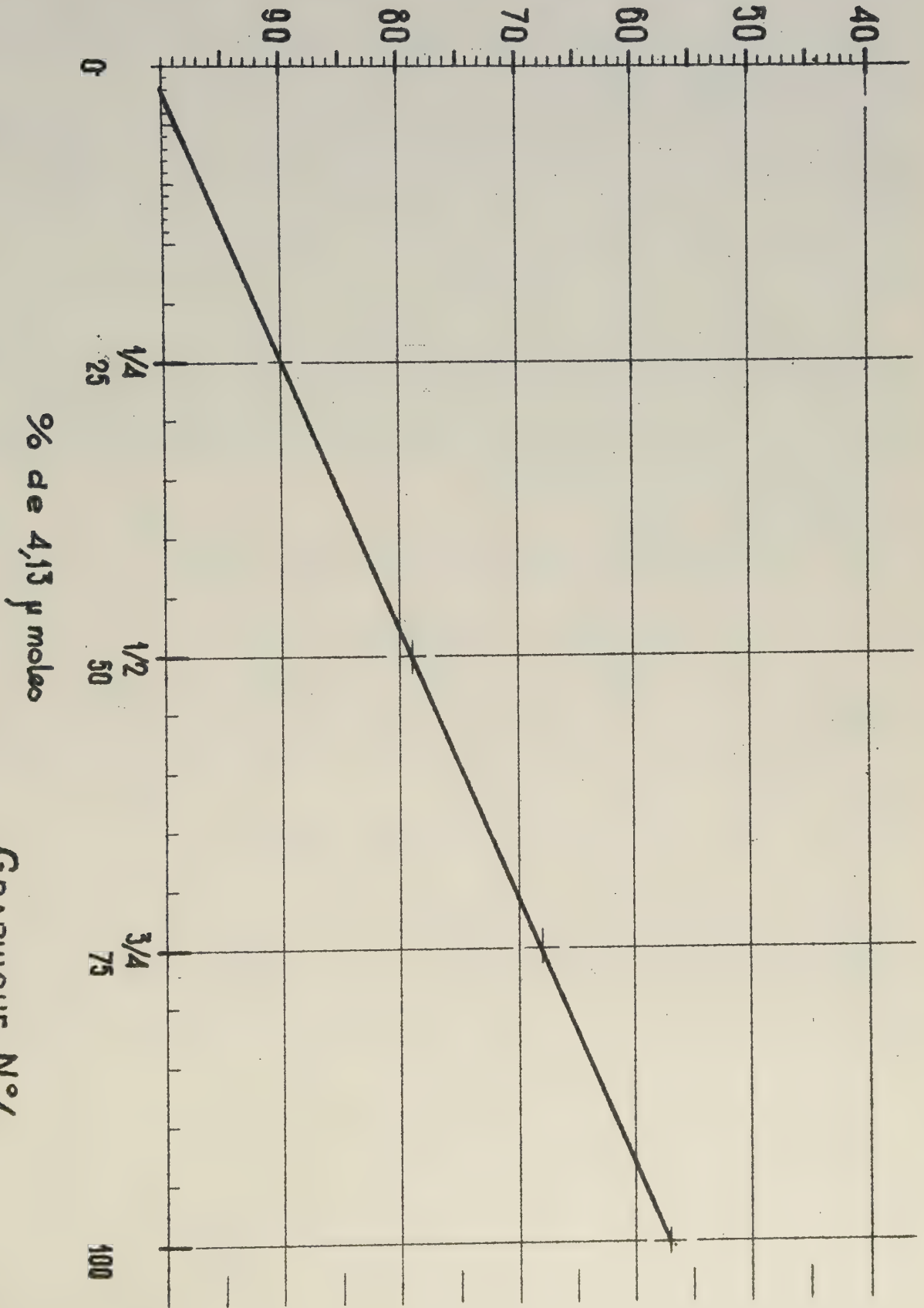
Substrat à 4,13 μ moles par ml

Tampon phosphate pH 7,2

0,25 ml = 25% de 4,13 μ moles
0,50 ml = 50% "
0,75 ml = 75% "
1 ml = 100% "

1,75
1,50
1,25
1

TRANSMISSIONS $1/D.O.$



GRAPHIQUE N° 4

Les densités optiques lues au spectrophotomètre sont portées en ordonnées sur un papier millimétré. (Graphique IV) Les abscisses représentent les pourcentages de substrat. Les 4 points obtenus sont situés sur une droite. Pour faire le calcul, on fait correspondre d'après la courbe d'étalonnage la densité optique au pourcentage de substrat. En multipliant ce chiffre par 4,13 on obtient le nombre de μ moles restant après hydrolyse, qu'il suffit de soustraire de 4,13 pour obtenir la quantité d'acétylcholine hydrolysée exprimée en μ moles.

Nous allons donner un exemple;

Soit une détermination de cholinestérases pour laquelle on a lu au spectrophotomètre le chiffre 75. Nous avons en effet par commodité effectué nos lectures en transmissions. D'après la courbe, il reste donc 59% de substrat non hydrolysé, soit $4,13 \times 59 = 2,44$ μ moles. L'activité enzymatique correspond à l'hydrolyse de

$$\frac{4,13 - 2,44}{100} = 1,89 \quad \mu \text{ moles dans des conditions standardisées}$$

II - Résultats obtenus à l'aide des techniques précédentes.

Plusieurs séries d'expériences ont été effectuées. Tout d'abord les manipulations étaient réalisées tantôt à 25°, tantôt à 37°. Cependant pour la commodité de l'exposé, nous grouperons les résultats obtenus en deux séries distinctes : l'une à 25°, l'autre à 37°. Seules les méthodes de W.E. ROBBINS et de S. CHARONNAT ont été réalisées aux deux températures.

1) Expériences à 25°

La technique manométrique étant toujours prise comme référence, nous avons réalisé les méthodes suivantes :

W.E. ROBBINS	: 10 minutes d'hydrolyse
S. CHARONNAT	: 30 minutes d'hydrolyse
R. TRUHAUT	: 10 minutes d'hydrolyse

Tous les résultats sont exprimés en μ moles d'acétylcholine hydrolysées en 30 minutes.

Pour convertir les microlitres de CO_2 obtenus d'après la technique manométrique, on utilise la formule suivante

$$\frac{x \mu\text{l CO}_2}{22,4} = n \mu \text{ moles d'acétylcholine}$$

En effet 1 molécule d'acétylcholine libère 1 molécule de $\text{CH}_3 - \text{COOH}$, qui réagit sur 1 molécule de $\text{CO}_3 \text{HNa}$ en libérant 1 molécule de CO_2 .

Nous avons opéré sur du sang humain et bovin ainsi que sur du plasma de chien provenant d'une expérimentation qui sera exposée plus loin.

Exprimés en μ moles d'acétylcholine hydrolysées et ramenés par le calcul à 30 minutes d'hydrolyse s'il y a lieu, les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau I Expérience à 25° (G.R. = globules rouges)

solution enzymatique Prise d'essai 0,05 ml	K.B. AUGUSTINSON manométrique	W.E. ROBBINS	Ecart %	S. CHARONNAT	Ecart %	R. TRUHAUT	Ecart %
G.R. boeuf	7,6	7,6	0	7,7	1,3	6	21
Sang. boeuf	3,7	3,8	2,7	3,9	5,4	3,1	16,2
G.R. humains	7,8	8	2,5	5,7	26,9	8,4	7,5
Plasma humain	2,7	2,4	11,1	2,8	3,7	4,2	55,5
Sang humain	5,2	5,6	7	4,7	9,6	7,5	44,2
Plasma chien	1,5	1,8	20	2,1	40	1,9	26,6
Moyenne des écarts % en valeur absolue			7,3		14,5		28,5

Pour chaque technique colorimétrique, nous avons calculé l'écart en valeur absolue du résultat obtenu avec celui de la méthode manométrique d'AUGUSTINSON, et nous l'avons exprimé en pourcentage. Nous avons ensuite déterminé la moyenne des écarts afin de constater quelle est la méthode qui se rapproche le plus de celle d'AUGUSTINSON. Pour des déterminations d'intérêt clinique, on peut tolérer un écart inférieur à 20 %.

Il en résulte que c'est la technique de W.E. ROBBINS qui semble la meilleure. Celle de S. CHARONNAT donne des résultats assez discordants et l'écart est déjà plus élevé. Les chiffres donnés par la méthode de R. TRUHAUT sont en général assez éloignés de ceux obtenus par la technique manométrique. Ce qui peut être du au fait que l'acide perchlorique est un mauvais déprotéinisant.

D'autre part l'hydrolyse à 25° pendant 10 minutes est très certainement insuffisante et les faibles écarts de coloration entre les divers tubes de la réaction sont une source d'erreur.

De plus, comme nous l'avons dit lors de l'exposé des conditions requises pour le dosage des cholinestérases, la température de 25° n'est pas physiologique. Aussi nous avons préféré poursuivre l'expérimentation à 37°.

2) Expériences à 37°

Nous n'avons pas réalisé la méthode de R. TRUHAUT à cette température, vu les résultats obtenus précédemment.

Seule la technique de H. GUYOT a été effectuée avec un temps d'hydrolyse de 10 minutes.

Le tableau que nous allons donner regroupe les résultats d'une série d'expériences réalisées pendant une période assez longue. Vu la conservation limitée du sang, certaines techniques n'ont pas pu être réalisées avec tous les échantillons:

Tableau II - Expériences à 37° (G.R. : globules rouges : Pl : Plasma)

Résultats exprimés en μ moles d'acétylcholine
hydrolysées, calculés en 30 minutes s'il y a lieu.

solution enzymatique (prise d'essai 0,05 ml)	K.B. AUGUSTINSON (manométrique)	H. GUYOT	Ecart %	D. VINCENT et SEGONZAC	Ecart %	W.E. ROBBINS 30 mn	Ecart %	S. CHARONNAT	Ecart %
G.R. H 1	10,6	9,6	9,4	8,4	20,7	10,2	3,8	9,4	11,3
Pl H 1	1,25	1,1	12	0,9	28	1,2	4	1,3	4
Sang H 1	5,8	4,9	15,5	4,5	22,4	6,2	6,9	4,8	17,2
G.R. H 2	10,5	8,1	23,8			10,9	3,8	10	4,7
Pl H 2	4,2	2,2	47,6			4,1	2,4	4,2	0
Sang H 2	7,4	6,3	14,8			8,2	10,8	6,1	17,5
G.R. B 1	9,6	6,1	36,4	6,7	30,2	9,8	2,1		
Sang B 1	4,6	3,5	23,9	3,8	17,3	4,3	6,5		
G.R. B 2	6,3	5,5	12,7			6,4	1,6	5,2	17,4
Sang B 2	2,7	2,4	11,1			3,1	14,8	2,5	7,4
H. Homme									
B. Boeuf									
Moyenne des écarts %			20,7		23,7		5,6		9,9

La technique originale de D. VINCENT et G. SEGONZAC n'était réalisable que sur du sérum. Nous avons été obligés de la modifier pour l'effectuer sur des globules rouges. Aussi nous avons ajouté en fin de réaction 0,2 ml d'acide tri-chloracétique à 40 % pour déprotéiniser le milieu, et nous avons filtré le tout. D'autre part la concentration de substrat indiqué par l'auteur s'est révélée insuffisante. Ce qui nous a amené à utiliser une solution de chlorure d'acétylcholine à 2 %. Les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants et c'est pourquoi nous avons abandonné la technique.

D. VINCENT et G. SEGONZAC ont publié depuis un mode opératoire utilisable pour des globules rouges. Nous en parlerons plus loin.

A 37°, les techniques de W.E. ROBBINS, de S. CHARONNAT et manométrique d'AUGUSTINSON donnent des résultats assez comparables entre eux.

Il n'en est malheureusement pas de même de la technique de H. GUYOT dont les chiffres sont de 20 % plus faibles en moyenne que ceux de la méthode manométrique.

Mais la discordance des écarts nous a conduit à réaliser une nouvelle série de déterminations sur du sang humain. Les résultats sont toujours exprimés en μ moles d'acétylcholine hydrolysées et ramenés par le calcul à 30 minutes d'hydrolyse s'il y a lieu.

Solution enzymatique prise d'essai 0,05 ml		K.B. Augustinnson manométrique	H. Guyot 10 mn	Ecart %	H. Guyot 30 mn	Ecart %
Globules rouges	1	10,4	8,1	22,1	5,8	44,2
"	2	11,3	6,7	40,7	6,1	45,1
"	3	12	7,7	35,8	4,8	60
Plasma	1	4,6	4,9	6,5	1,7	63
"	2	4,8	2,2	54,1	2,3	52,1
"	3	3,7	1,9	48,6	1	72,9
Sang	1	7,8	4,9	37,1	3,9	50
"	2	9,2	7,3	20,6	3,9	57,6
"	3	7,7	6,3	18,1	3,9	49,3

Pour un temps d'incubation de 10 minutes, l'écart moyen avec les résultats de la méthode manométrique est de 31,5 %. Pensant que ce temps était trop court, nous avons tenté un essai en laissant l'hydrolyse se réaliser pendant 30 minutes. Les écarts avec les chiffres de la technique sont encore plus grands et atteignent 55%.

Nous avons remarqué qu'au moment de l'introduction des 4 ml d'acide trichloracétique à 5%, la couleur des tubes s'affaiblissait ainsi que le signale H. GUYOT, ce qui peut produire une cause d'erreur.

Vu ces résultats défectueux, la méthode de H. GUYOT ne sera pas utilisée pour les déterminations ultérieures.

Une interprétation nous paraît vraisemblable : une partie de la matière colorante est entraînée avec les protéines floculées et la proportion demeurant en solution est évidemment beaucoup plus faible dans le cas d'une hydrolyse prolongée, où la quantité d'acétylcholine résiduelle est plus faible.

III) Influence du Diparcol sur les cholinestérases globulaires et plasmiques d'après la technique de D. VINCENT et G. SEGONZAC publiée en avril 1965 (107)

Selon D. VINCENT et G. SEGONZAC, le Diparcol inhibe sélectivement la pseudo cholinestérase du plasma. En se fondant sur ce fait, ils ont publié une technique de dosage des cholinestérases sur le sang total, d'après la réaction colorimétrique de HESTRIN.

L'hydrolyse est réalisée sur deux échantillons, un seul renfermant du Diparcol. Le tube qui n'en contient pas représente le dosage global de la cholinestérase sanguine, l'autre ne permettra que la détermination de l'enzyme globulaire. Connaissant l'hématocrite du sujet, on pourra par un calcul déterminer le taux d'enzyme plasmique par différence.

1) Mode opératoire de la technique de D. VINCENT au Diparcol

Dans un premier temps, on réalise une dilution de sang au 1/10 dans l'eau distillée. On agite pour hémolyser les globules rouges. Cette dilution sera utilisée pour le dosage.

Le tampon véronal et les réactifs de la réaction colorée sont identiques à ceux vus pour la technique de D. VINCENT et G. SEGONZAC sur le sérum. La solution de Diparcol est utilisée à 0,04 %. Le mode opératoire est indiqué dans le tableau suivant :

	Echantillon I	Echantillon II	Témoin substrat	Témoin réactif
Sang au 1/10	0,2 ml	0,2 ml	-	-
Tampon véronal pH 7,4	0,8 ml	0,7 ml	0,8 ml	1,8 ml
Solution de Diparcol à 0,04 %	-	0,1 ml	-	-

Bain-marie à 37° 5 minutes

	1 ml	1 ml	1 ml	-
Chlorure d'acétylcholine à 1% dans le tampon				

Incubation 30 minutes

	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Acide trichloracétique 10 %				
Sang au 1/10	-	-	0,2 ml	0,2 ml

On centrifuge, prélève 1,5 ml de liquide

	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Solution d'hydroxylamine alcaline				
ClH 4 N	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
Cl3 Fe 10 %	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
H ₂ O	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml

Lecture au spectrophotomètre à 540 mμ

La prise d'essai de sang est donc pour cette technique de 0,02 ml.

2) Résultats obtenus. Comparaisons avec les méthodes d'AUGUSTINSON et de W.E. ROBBINS.

D. VINCENT et G. SEGONZAC affirment que le Diparcol inhibe sélectivement l'enzyme du plasma. Mais la cholinestérase globulaire est-elle totalement respectée par cet inhibiteur ? Aussi parallèlement au dosage sur sang total, nous avons étudié l'action du Diparcol sur les globules rouges et le plasma séparément, en utilisant les techniques manométriques et colorimétriques selon W.E. ROBBINS et D. VINCENT. Pour conserver le rapport inhibiteur-prise d'essai, nous avons ainsi modifié les méthodes de K.B. AUGUSTINSON et de W.E. ROBBINS.

Compartiment central fiole de Warburg	Tube à essai pour W.E. ROBBINS
0,05 ml globules rouges, plasma ou sang	0,70 ml solution de saponine
0,25 ml solution de Diparcol à 0,04 %	0,25 ml solution de Diparcol à 0,04 %
2,3 ml tampon bicarbonate	0,05 ml globules rouges, plasma ou sang.

Nous avons utilisé le mode opératoire habituel pour les autres réactifs et les échantillons sans Diparcol.

Les essais ont été réalisés sur du sang humain et les résultats exprimés en μ moles de substrat hydrolysés en 30 minutes pour 0,05 ml de prise d'essai :

Prise d'essai (0,05 ml)	K.B. AUGUSTINSON (manométrique)	W.E. ROBBINS	Ecart %	D. VINCENT	Ecart %
Globules rouges	12,1	10,9	9,9	11,9	1,7
" + Diparcol	10,9	10,3	5,5	11	0,9
Plasma	3,9	2,9	25,6	3,3	15,3
" + Diparcol	0,3	0,2	3,3	0	10
Sang	7,7	7,2	6,5	7,2	6,5
" + Diparcol	5,9	6,1	3,4	5,1	13,5
Moyenne des écarts			9		8

L'enzyme plasmatique est effectivement inhibé dans sa totalité par le Diparcol au cours du dosage selon D. VINCENT. Dans les deux autres méthodes, une très légère activité subsiste. Par contre toutes les techniques montrent une diminution du taux des cholinestérases globulaires sur l'échantillon mis en présence de Diparcol. Celle-ci est pour l'expérience réalisée de :

- 9,9 % pour la technique manométrique
- 5,5 % " colorimétrique de W.E. ROBBINS
- 7,5 % " " de D. VINCENT

soit une diminution de 7,6 % en moyenne. Ce qui est loin d'être négligeable.

Nous avons d'ailleurs, comme le proposait D. VINCENT, réalisé le calcul du taux des cholinestérases globulaires et plasmatiques à partir de l'hématocrite. Le sang analysé contenait 52 % de globules rouges, et nous avons ramené les résultats calculés à 0,05 ml de globules ou de plasma. Ce qui donne :

	K.B. AUGUSTINSON (manométrique)	W.E. ROBBINS	D. VINCENT
Globules rouges	11,5	12	10
Plasma	3,7	2,25	4,1

Nous ne retrouvons donc pas les chiffres obtenus par dosage direct sur les globules rouges ou le plasma et ce fait est certainement du à l'inhibition partielle de l'enzyme globulaire par le Diparcol.

D'autre part nous pouvons remarquer que la technique de D. VINCENT adaptée au dosage de l'enzyme des globules rouges donne des résultats assez comparables à ceux de la méthode manométrique.

Cependant cette expérimentation faite sur un seul sang humain nous a paru insuffisante pour tirer des conclusions définitives. Aussi nous avons réalisé la méthode de D. VINCENT sur trois échantillons et l'avons mise en parallèle avec la technique manométrique.

Pour réaliser cette série de déterminations, nous avons adopté la prise d'essai de 0,05 ml de solution d'enzyme dans la technique de D. VINCENT. Au lieu des 0,2 ml de dilution de sang au 1/10, nous avons mis :

Solution enzymatique 0,05 ml
H₂O 0,15 ml

En effet la dilution préalable du sang se prête mal aux dosages en série. D'autre part l'utilisation d'une prise d'essai aussi faible n'est pas sans inconvénient. Si les échantillons à analyser ont un taux d'enzyme peu élevé, les colorations finales sont presque identiques et il suffit d'une très petite erreur de manipulation pour obtenir des résultats absurdes.

Nous avons également supprimé les témoins substrats et réactifs avec chaque fraction sanguine, qui obligerait pour les dosages en série à utiliser 4 tubes pour chaque détermination. Les témoins ont été réalisés selon les techniques colorimétriques classiques, ce qui représente un gain de temps appréciable sans diminuer la précision de la méthode. Les résultats sont exprimés en μ moles d'acétylcholine hydrolysés en 30 minutes.

Prise d'essai (0,05 ml)	Hématocrite	K.B. AUGUSTINSON (manométrique)	D. VINCENT	Ecart %	D. VINCENT + Diparcol	Ecart %
Globules rouges 1		10,4	9,7	6,7	9,1	12,5
" 2		11,3	11,2	0,8	9,9	12,4
" 3		12	11,5	4,1	10,3	14,1
Plasma 1		4,6	5,0	8,7	0,9	non significatif car enzyme plasmatique inhibé
" 2		4,8	5,3	10,4	0	
" 3		3,7	3,8	2,7	0,6	
Sang 1	41,9 %	7,8	7,5	3,8	3,7	
" 2	46,9 %	9,2	8,6	6,5	4,4	
" 3	49,1 %	7,7	8,1	5,2	4,7	
Moyenne des écarts				5,4		13 pour globules rouges seule- ment.

Les résultats confirment les précédents. Pour 2 échantillons sur 3, l'enzyme plasmatique n'est pas complètement inhibé par le Diparcol. L'inhibition partielle de la cholinestérase globulaire est confirmée et elle est de 9,5 % en moyenne pour les 3 échantillons. Nous avons ici pratiqué le calcul du taux d'enzyme globulaire et plasmatique à partir des résultats trouvés pour le sang, et en tenant compte de l'hématocrite, nous avons obtenu :

	Globules rouges	Plasma
1	8,8	6,5
2	9,4	7,9
3	9,8	6,7

Les taux retrouvés ainsi sont trop faibles pour les globules rouges et beaucoup trop forts pour le plasma. Il en résulte que les résultats obtenus à partir du sang total ne sont absolument pas comparables à ceux provenant du dosage des globules rouges et du plasma isolément. Aussi on a avantage à séparer les globules rouges et le plasma pour réaliser les déterminations de cholinestérases.

Cette réserve étant faite, la technique de D. VINCENT et G. SEGONZAC sans Diparcol donne des résultats assez comparables à ceux de la méthode manométrique.

IV) Expériences sur sang sec réalisées selon la technique de W.E. ROBBINS (90)

Ayant antérieurement réalisé des essais sur taches de sang sec au manomètre de WARBURG selon la technique d'AUGUSTINSON (9, 11), nous avons voulu à titre de

comparaison appliquer la méthode colorimétrique de W.E. ROBBINS sur ces mêmes taches de sang.

La prise d'essai a été fixée à 0,03 ml, comme pour les expériences réalisées au manomètre à 37°. Trois heures après le prélèvement, la tache est découpée et les fragments introduits dans un tube à essai renfermant déjà 1 ml de solution de saponine à 0,01 %. On agite, et on laisse reposer pour hémolyse. La mise en route de l'hydrolyse enzymatique et la réalisation de la réaction colorée s'effectuent selon la technique colorimétrique de W.E. ROBBINS classique.

Nous obtenons les résultats suivants, calculés en μ moles d'acétylcholine hydrolysées en 30 minutes, pour 0,03 ml de globules rouges humains.

Globules rouges humains N°	Technique de W.E. ROBBINS sur sang liquide	Technique sur sang sec
1	7,5	6,1
2	7,7	6,5
3	6,5	5,1

Les chiffres obtenus sont beaucoup plus faibles avec les taches de sang sec. Ce qui provient probablement du fait que par suite de la non agitation pendant l'hydrolyse, il reste une bonne partie de l'enzyme sur le papier.

Aussi nous avons effectué un nouvel essai. Après la mise en contact des morceaux de papier filtre imprégnés de sang sec avec la solution de saponine, nous avons laissé le tout 10 minutes au repos. Puis au moyen d'un agitateur, nous avons retiré le papier filtre support et nous l'avons exprimé de façon à recueillir le maximum de liquide. Nous l'avons rincé avec 1 ml de solution de saponine, que nous avons joint à l'hémolysat précédent. Nous avons alors réalisé la technique de W.E. ROBBINS classique et obtenons les résultats suivants, toujours exprimés en μ moles d'acétylcholine hydrolysées en 30 minutes, pour 0,03 ml de globules rouges.

Globules rouges humains	Technique de W.E. ROBBINS sur sang liquide	Technique sur sang sec
4	7,2	5,8
5	6,4	5,4
6	7,6	5,9

Malgré la modification apportée, les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants. Le rinçage du papier filtre ne paraît pas en éliminer toutes les cholinestérases. D'autre part, ces manipulations supplémentaires entraînent des pertes de solution enzymatique.

Il en résulte que la technique sur sang sec est pratiquement inapplicable en colorimétrie, donnant des valeurs nettement abaissées.

V) Rappel de la technique colorimétrique de W.E. ROBBINS (90) telle que nous l'avons adaptée.

Cette technique nous ayant donné les résultats les plus comparables à ceux de la méthode manométrique, du moins pour les sangs humains et bovins, et s'étant révélée la plus rapide et la plus commode, nous allons en rappeler le mode opératoire.

Dans un tube à essai (tube réaction), on mélange :

- 0,95 ml de solution de saponine à 0,01 %

- 0,05 ml de globules rouges ou de plasma

Bien agiter pour hémolyser

Puis on prépare le substrat à 4, 13 μ moles/ml

- 0,15 ml de solution de chlorure d'acétylcholine à 5 %

- 9,85 ml de tampon phosphate pH 7,2 (la composition a été donnée page 72)

Il est parfois nécessaire de disposer en plus d'une solution plus concentrée (8,26 ou 12,39 μ moles/ml). Les doses ci-dessus sont alors à modifier en conséquence.

On réalise également :

- un témoin substrat : 1 ml de tampon phosphate pH 7,2

- " " réactif : 2 ml " "

On porte le tout au bain-marie à 37°. Après 5 minutes de repos, on verse dans les tubes réaction et le témoin substrat 1 ml de la dilution de chlorure d'acétylcholine précédemment préparée. On mélange avec soin.

On laisse l'hydrolyse se réaliser pendant 30 minutes exactement.

Pendant ce temps, on mélange 1 volume de Na OH 3,5 N et 1 volume de solution de chlorure d'hydroxylamine à 13,9 %.

Aussitôt le temps d'hydrolyse de 30 minutes écoulé, on ajoute à tous les tubes 4 ml d'hydroxylamine alcaline, puis après 2 minutes de repos, 2 ml de ClH 4 N, ce qui précipite les protéines, et enfin 2 ml de Cl₃Fe à 10 %. On filtre pour obtenir une solution limpide.

10 minutes après l'addition de Cl₃Fe, on lit au spectrophomètre JOBIN et YVON à 540 m μ .

Si l'on a employé un substrat à 8,26, ou 12,39 μ moles/ml il peut arriver qu'un ou plusieurs tubes réaction soient plus foncés que le témoin substrat à 4,13 μ moles/ml. Il est nécessaire de pratiquer alors une dilution appropriée pour pouvoir effectuer la lecture spectrophotométrique.

Le principe du calcul a été exposé page 76 et les résultats sont exprimés en micromoles de chlorure d'acétylcholine hydrolysées en 30 minutes pour 0,05 ml de prise d'essai.

VI) Temps nécessaire à la réalisation des diverses manipulations.

D'après les expériences précédentes, nous disposons de trois méthodes aux résultats à peu près comparables : celles de K.B. AUGUSTINSON, de W.E. ROBBINS et de D. VINCENT.

Mais un problème se pose à l'expérimentateur : si l'on a une série de sangs sur lesquels on veut doser les cholinestérases et donner une réponse rapide, avec le maximum de précision, quelle technique adopter ? Aussi nous allons exposer le temps nécessaire pour la réalisation des trois méthodes citées plus haut.

Toutes exigent la séparation des globules rouges et du plasma ainsi que deux lavages globulaires avec de l'eau physiologique. Ce qui donne trois centrifugations de 10 minutes chacune et un temps d'environ 20 minutes pour les autres opérations. La préparation des globules rouges lavés demande donc environ 50 minutes.

1) Technique manométrique de K.B. AUGUSTINSON (réalisée avec 8 échantillons et un témoin substrat).

- | | |
|--|------------|
| - Préparation du mélange gazeux, indispensable avant chaque manipulation : | 40 minutes |
| - Opérations préliminaires diverses (préparation du tampon, saturation de celui-ci par CO ₂ , etc) : | 15 minutes |
| - Disposition des fioles | 5 minutes |
| - Pipetage du sang et des réactifs | 30 minutes |
| - Graissage des rodages des manomètres et bouchons purgeurs | 10 minutes |
| - Préparation du substrat, passage du mélange gazeux dans les fioles, pipetage du substrat et mise en place des manomètres | 25 minutes |

- Passage du mélange gazeux dans les manomètres	20 minutes
- Equilibre des températures	20 minutes
- Lectures	40 minutes
- Lavage des fioles	10 minutes
- Total	3 heures 30 minutes

La méthode est précise, mais de réalisation assez longue. Le chauffage du bain-marie s'effectue pendant la préparation de la manipulation.

2) Technique colorimétrique de W.E. ROBBINS (sur 3 échantillons et 2 témoins).

- Chauffage du bain marie	25 minutes
- Pipetage de la solution de saponine et du tampon des témoins	2 minutes
- Pipetage du sang	4 minutes
- Préparation du substrat et de ses dilutions	2 minutes 30
- Pipetage du substrat	2 minutes
- Incubation	30 minutes
- Préparation de l'hydroxylamine alcaline	45 secondes
- Pipetage de cette solution	2 minutes
- " du Cl H 4 N	2 minutes
- " du Cl ₃ Fe	2 minutes
- Filtration	5 minutes
- Lectures au spectrophotomètre	11 minutes
- Total (chauffage du Bain-Marie non compris)	Environ 1 heure

Le pipetage du substrat et la préparation de l'hydroxylamine alcaline sont compris dans les 30 minutes d'incubation. Seulement le temps de chauffage du bain-marie allonge l'opération à 1 h.20 environ. Néanmoins cette technique est beaucoup plus rapide que celle de K.B. AUGUSTINSON.

3) Technique colorimétrique de D. VINCENT (sur 6 échantillons et 6 témoins)

- Etiquetage de 12 tubes à centrifuger	1 minute 30
- Dilutions de sang	4 minutes
- Pipetage des dilutions	2 minutes 30
- " du Diparcol	30 secondes
- " du tampon	3 minutes 30
- Préparation du substrat	1 minute 30
- Installation des tubes au bain-marie et temps de repos	5 minutes
- Pipetage du substrat	3 minutes 30
- Incubation	30 minutes
- Préparation de l'hydroxylamine alcaline	1 minute
- Pipetage de l'acide trichloracétique	3 minutes 30
- Pipetage du sang des témoins	2 minutes 30
- Centrifugation	25 minutes
- Pipetage des 1,5 ml de surnageant	7 minutes 30
- Pipetage de l'hydroxylamine alcaline	3 minutes 30
- Pipetage Cl H 4 N	2 minutes
- " Cl ₃ Fe	2 minutes
- " H ₂ O	2 minutes
- Lectures au spectrophotomètre	16 minutes
- Total	Environ 2 heures

La méthode est donc beaucoup plus longue que la précédente, bien que l'expérience ait porté sur 6 échantillons. Ce qui est dû aux transferts des tubes : deux séries de tubes à essai et une de tubes à centrifuger sont nécessaires.

D'autre part la centrifugation nécessite un temps plus long que la filtration, d'autant plus que la centrifugeuse ne peut contenir que 4 tubes à la fois.

Cette méthode à résultats égaux est donc de réalisation plus longue que la précédente.

Nous n'avons pas mesuré de façon précise les temps de manipulation de la méthode de S. CHARONNAT. Celle-ci nécessite également une centrifugation, mais ne comporte pas de dilutions de sang à réaliser au préalable. Elle nécessiterait donc pour sa réalisation un temps un peu plus court que la méthode de D. VINCENT.

Les temps indiqués plus haut ne comprennent pas la durée de préparation des réactifs. Ils n'ont pas été mesurés à la seconde près et permettent seulement de donner une indication globale de la durée de la manipulation. Celle-ci peut évidemment varier avec le nombre d'échantillons à analyser, le matériel dont on dispose et l'habileté de l'expérimentateur.

Pour chaque mode opératoire, nous devons faire remarquer que le déroulement des diverses manipulations comporte des temps morts, ce qui rend possible la conduite simultanée de la technique de K.B. AUGUSTINSON et de celle de W.E. ROBBINS par exemple. Un peu plus de 4 heures sont nécessaires pour effectuer les deux méthodes à la fois.

Nous pouvons conclure que si l'on désire une réponse rapide, la technique colorimétrique de W.E. ROBBINS est la meilleure, suivie d'assez près par celles de D. VINCENT et de S. CHARONNAT. Un peu moins de 2 heures sont nécessaires pour la réaliser, y compris la séparation et le lavage des globules. Elle peut donc rendre certains services en urgence, dans le cas d'une intoxication aigüe par un composé anticholinestérasique.

Si l'on dispose d'un temps plus long, par exemple pour des contrôles réguliers du taux des cholinestérasas chez des travailleurs qui manipulent des organophosphorés, il vaut mieux conduire en même temps la technique manométrique et une détermination par colorimétrie.

C) Méthode électrométrique de MICHEL (81)

Nous n'avons pas pratiquée nous-mêmes la méthode électrométrique. Mais lors de l'expérimentation ultérieure sur les bovidés, elle a été utilisée à l'Ecole Vétérinaire pour le dosage des cholinestérasas dans les globules rouges des génisses de la ferme expérimentale de VILLARS les DOMBES. Les résultats obtenus nous ont été communiqués par Monsieur le Professeur MAGAT et nous les avons joints aux nôtres. Aussi nous allons exposer ici le mode opératoire utilisé.

La méthode électrométrique a été adaptée par CHARY et ses collaborateurs (23) au titrage de l'activité cholinestérasique sanguine chez les bovins. Le protocole expérimental de ces auteurs est le suivant :

Il est nécessaire de disposer d'un pH-mètre d'une grande sensibilité (1/100 unité pH)

Le sang est prélevé sur héparine. Après centrifugation et lavage des hématies, on prélève 0,5 ml de sédiment globulaire qu'on hémolyse dans 49,5 ml d'une solution aqueuse de saponine à 0,1 g% (hémolysant au 1/100).

Le tampon coloré est préparé selon la formule suivante :

- Véronal sodique	0,315 g
- Cl K	68 g
- Bleu de bromothymol	0,142 g
- Eau bidistillée q.s.q.	1 000 ml

Ce tampon doit avoir un pH de 8,1 et sa conservation est limitée à 5 jours à + 4°.

Le substrat est constitué par une solution aqueuse de chlorure d'acétylcholine à 10 mg/ml.

La réaction est réalisée comme suit : à 5 ml d'hémolysat , soit 0,05 ml de globules rouges, on ajoute 4 ml de solution tampon. On attend 10 minutes. Puis le mélange est porté à 37°. Ensuite on verse et mélange rapidement 1 ml de substrat. On note l'instant précis de l'addition et le pH initial qui est normalement très voisin de 7,5. Au pH-mètre, on note le pH toutes les 10 minutes jusqu'à 30 minutes.

On doit également réaliser un témoin substrat en remplaçant la solution d'enzyme par 5 ml d'eau distillée. Il permet de mesurer l'hydrolyse spontanée du substrat. Celle-ci ne doit pas normalement excéder quelques centièmes d'unités pH.

DEUXIEME PARTIE

TAUX NORMAL DES CHOLINESTERASES GLOBULAIRES ET PLASMATIQUES CHEZ L'HOMME ET CHEZ QUELQUES ESPECES ANIMALES

Avant d'entreprendre l'étude du pouvoir anticholinestérasique des composés organophosphorés utilisés dans la lutte contre le varron, il nous a paru intéressant d'évaluer le taux normal des cholinestérases globulaires et plasmatiques chez l'homme et chez les principaux animaux domestiques : boeuf, mouton, chèvre, porc, chien, chat, lapin et poulet. Cette détermination a été également effectuée chez le singe à titre comparatif.*

Le taux normal des cholinestérases chez l'homme a été indiqué par de nombreux auteurs, en particulier par AUGUSTINSON (9), CALLAWAY (13) et GAGE (45). Chez le boeuf, une série de dosages par la méthode manométrique a été réalisée en Norvège par DYBING et HJELLE (37). Enfin MENDELL et ses collaborateurs (77) et plus tard Y. RUCKEBUSCH et M. RUCKEBUSCH (94, 95) ont déterminé le taux de cholinestérase et de pseudocholinestérase chez diverses espèces animales.

Ces auteurs ont d'ailleurs constaté que le taux d'enzyme aussi bien globulaire que plasmatique varie d'une espèce animale à l'autre, et que certaines d'entre elles, en particulier les Ruminants, ne comportent pas de cholinestérase dans leur plasma.

La connaissance du taux normal des cholinestérases globulaires et plasmatiques a une grande importance en toxicologie, principalement chez l'homme. En effet le laboratoire de contrôle peut être amené à réaliser une détermination des cholinestérases chez un sujet intoxiqué par les composés organophosphorés. Ne connaissant pas le taux d'enzyme avant l'intoxication, il sera nécessaire de se référer à un chiffre moyen, obtenu sur un certain nombre d'individus normaux.

Plus rarement, le toxicologue pourra être amené à effectuer une détermination des cholinestérases chez les animaux domestiques. Ceux-ci peuvent se trouver accidentellement en contact avec des insecticides, ou même des produits utilisés dans la lutte contre le varron, d'où possibilités d'intoxications.

Tous ces faits justifient l'intérêt de notre étude. Les sangs ont été prélevés sur héparine. Pour le dosage des cholinestérases globulaires et plasmatiques, nous avons retenu et utilisé principalement la méthode manométrique de K.B. AUGUSTINSON et la technique colorimétrique de W.E. ROBBINS. Parfois d'autres modes opératoires ont pu être mis en oeuvre et nous en mentionnerons les résultats s'il y a lieu. Dans tous les cas, l'hydrolyse enzymatique du chlorure d'acétylcholine a été réalisée à 37°.

Nous allons donner successivement les tableaux des valeurs obtenus pour les sangs des diverses espèces animales étudiées. Dans chacun d'eux, nous indiquerons la moyenne des taux de cholinestérases globulaires et plasmatiques. Les résultats obtenus pour l'homme et chaque animal seront rassemblés dans un tableau que nous discuterons.

* Le sang de singe nous a été gracieusement fourni par l'Institut MERIEUX, par l'intermédiaire du Docteur NICOLAS. Qu'ils trouvent ici l'expression de nos plus vifs remerciements.

I - HOMME

13 sangs ont été dosés à 37° au cours de diverses manipulations. Sur les 3 derniers, le taux de cholinestérase plasmatique n'a pas été déterminé.

1) GLOBULES ROUGES (Prise d'essai : 0,05 ml)

Numéro de l'échantillon	Méthode manométrique		Méthodes colorimétriques		
	$\mu\text{l CO}_2$ 30 mn ²	$\mu\text{moles d'acétylcholine hydrolysées en 30 mn.}$	W.E. ROBBINS	S. CHARONNAT	D. VINCENT
1	236	10,5	10,9	10	
2	217	9,8	9,9	8,5	
3	241	10,6	10,2	9,4	
4	271	12,1	10,9		11,1
5	234,5	10,4	10,2		9,7
6	254	11,3	11		10,2
7	270	12	11,3		11,5
8	293	13	12,5	14	
9	315	14	13	15,5	
10	231,5	10,3	10,8	10	
11	275,5	12,4	12		
12	247,5	11	10,5		
13	314	14	12,6		
Moyenne	261,5	11,6	11,2	11,2	10,8

2) PLASMAS (Prise d'essai : 0,05 ml)

Numéro de l'échantillon	Méthode manométrique		Méthodes colorimétriques		
	$\mu\text{l CO}_2$ 30 mn ²	$\mu\text{moles d'acétylcholine hydrolysées en 30 mn.}$	W.E. ROBBINS	S. CHARONNAT	D. VINCENT
1	94,5	4,2	4,2	4,2	
2	100	4,4	4,5	4,3	
3	80	3,6	4	4,7	
4	88,5	3,9	2,9		2,6
5	102,5	4,6	4,3		5,0
6	107	4,8	4,4		5,3
7	83	3,7	3,2		3,8
8	113,5	5,1	4,7		
9	87	3,8	3,2		
10	81,5	3,6	2,9		
Moyenne	93,5	4,2	3,9	4,4	4,2

Le rapport moyen $\frac{\text{cholinestérase globulaire}}{\text{plasmatique}}$ est de 2,7

II - SINGES

Le sang que nous avons analysé provient de singes de la race Cercopithecus Patas, originaires soit de la République du Sénégal, soit de la République du Tchad. Ils ont séjourné 3 mois à l'Institut MERIEUX à Marcy l'Etoile. Ils sont nourris de fruits et d'un aliment composé vitaminé à base d'avoine, germes et son fin de blé, tourteaux d'arachide, de soja et de coprah, farine de luzerne déshydratée, sels minéraux et vitamines.

Nous obtenons les résultats suivants :

Globules rouges prise d'essai N° 0,05 ml	Méthode manométrique		Méthode colorimétrique W.E. ROBBINS
	$\mu\text{l CO}_2$ 30 mn	μ moles d'acétylcholine hydrolysées en 30 mn	
1 (Patas femelle)	266	11,8	10,5
2 (" ")	182,5	8,1	6,9
3 (" ")	231,5	10,3	9,4
4 (Singe Vert)	207	9,2	8,5
Moyenne	221,5	9,8	8,8
Plasmas Prise d'essai 0,05ml N°			
1	19	0,85	0,65
2	14,5	0,65	0,45
3	9	0,4	0,2
4	7	0,3	0
Moyenne	12	0,55	0,3

Le rapport moyen $\frac{\text{cholinestérase globulaire}}{\text{plasmatique}}$ est de 17,8

III - CHIEN

Il n'a été possible de réaliser ces dosages que sur 2 chiens qui nous ont servi à expérimenter des produits organophosphorés destinés à la lutte contre le varron.

Les chiffres donnés dans le tableau qui suit concernant des cholinestérases réalisé avec le sang prélevé avant applications des produits à essayer.

Echantillons Prise d'essai 0,05 ml	Méthode manométrique		Méthode colorimétrique W.E. ROBBINS
	$\mu\text{l CO}_2$ en 30 mn	μ moles substrat hydrolysées en 30 minutes	
Globules rouges			
1	41	1,8	1,9
2	39	1,7	1,8
Plasma			
1	25	1,1	1,1
2	65	2,9	2,3
Moyenne :			
Globules rouges	40	1,75	1,85
Plasma	45	2	1,7

Le rapport moyen $\frac{\text{cholinestérase globulaire}}{\text{" plasmatique}}$ est de 0,97

IV - CHAT

Un seul prélèvement de sang a pu être effectué sur un chat anesthésié au Nembutal et nous a donné les résultats suivants :

Prise d'essai 0,05 ml	Méthode manométrique		Méthode colorimétrique W.E. ROBBINS
	$\mu\text{l CO}_2$ en 30 mn	μ moles acétylcholine hydrolysées en 30 minutes	
Globules rouges	27	1,2	1,0
Plasma	65	2,9	1,6

Nous remarquons encore que pour le plasma, le résultat obtenu par colorimétrie est beaucoup plus faible que celui donné par la méthode manométrique. Nous avons essayé d'interpréter cette anomalie.

Or la réaction de HESTRIN n'est en fait pas spécifique. Vu que la méthode colorimétrique repose sur un dosage par différence, nous avons pensé que le plasma contenait peut être une substance inconnue réagissant avec l'hydroxylamine, ce qui donnerait un excès d'hydroxamate ferrique coloré.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué la réaction colorée sur une dilution de 0,05 ml de plasma dans 1,95 ml d'eau distillée, sans mettre d'acétylcholine.

Nous avons constaté qu'il apparaissait dans ces conditions une légère coloration. Après lecture au spectrophotomètre, nous avons calculé l'équivalence de cette coloration en micromoles de chlorure d'acétylcholine, et nous avons ajouté le chiffre obtenu au résultat trouvé pour le plasma par la méthode colorimétrique de W.E. ROBBINS. Nous obtenons alors, dans le cas particulier, 2,3 micromoles d'acétylcholine hydrolysées en 30 minutes.

Cette valeur est encore inférieure à celle trouvée par la méthode manométrique.

Le rapport $\frac{\text{cholinestérase globulaire}}{\text{plasmatique}}$ est de 0,42

V - CHEVAL

2 sangs de chevaux ont été prélevés à l'abattoir.
Nous avons obtenu les résultats suivants :

		Méthode manométrique		Méthode colorimétrique W.E. ROBBINS
		$\mu\text{l CO}_2$ en 30 mn	μ moles acétylcholine hydrolysées en 30 minutes	
Globules rouges	1	67,5	3,0	3,2
"	2	63,5	2,8	3,0
Plasma	1	84	3,7	2,0
	2	97	4,3	2,5
Moyenne				
Globules rouges		65,5	2,9	3,1
" Plasma		90,5	4,0	2,25

Comme chez le chat, les résultats obtenus pour le plasma par colorimétrie sont nettement plus faibles que ceux donnés par la méthode manométrique.

Aussi nous avons repris le protocole expérimental précédemment exposé pour le plasma de chat. Dans les tubes où nous avons effectué la réaction de HESTRIN sur une dilution de plasma de cheval sans ajouter d'acétylcholine, il apparaît également une coloration. Nous avons alors, après lecture au spectrophotomètre, calculé le facteur de correction à ajouter aux chiffres précédents. Nous obtenons alors :

Méthode colorimétrique W.E. ROBBINS Valeurs corrigées

Plasma	1	2,8	μ moles d'acétylcholine hydrolysées en 30 minutes
"	2	3,4	"
Moyenne		3,1	"

Comme chez le chat, ces chiffres sont encore inférieurs à ceux obtenus par la méthode manométrique.

Le rapport $\frac{\text{cholinestérase globulaire}}{\text{plasmatique}}$ est de 0,84

VI - BOEUF

1) Bovins adultes

3 sangs de vaches ont été prélevés à l'abattoir.
Nous obtenons les résultats suivants :

Echantillons Prise d'essai : 0,05 ml	Méthode manométrique		Méthode colorimétrique W.E. ROBBINS
	μ l CO ₂ en 30 mn	(μ moles substrat hydrolysées en 30 minutes)	
Globules rouges			
1	215	9,6	10,3
2	164	7,1	7,4
3	142,5	6,3	5,9
Plasma			
1	2,5	0,1	0
2	3	0,1	0,3
3	2,5	0,1	0
Moyenne :			
Globules rouges	180,5	7,7	7,8
Plasma	2,7	0,1	0,1

Le rapport $\frac{\text{cholinestérase globulaire}}{\text{plasmaticque}}$ est de 77,5

2) Génisses de 18 mois de la Ferme Expérimentale du Centre Technique du Cuir à Villars-les-Dombes (Ain)

Il s'agit d'animaux normaux comme nous l'expliquerons plus loin au cours de l'expérimentation des produits utilisés dans la lutte contre le varron (page 109)

Outre les techniques habituelles, un dosage de cholinestérases globulaires a été réalisé au Laboratoire de Chimie Biologique à l'Ecole Vétérinaire selon la méthode électrométrique de MICHEL, modifiée par CHARY et ses collaborateurs. Les résultats nous ont été communiqués par Monsieur le Professeur MAGAT et seront notés dans le tableau suivant.

Nous n'avons réalisé que deux déterminations de cholinestérases plasmatiques. Les résultats obtenus confirmant la très faible teneur de cet enzyme dans le plasma des bovidés, nous n'avons pas jugé d'effectuer ces dosages chez les 36 génisses.

CHOLINESTERASES GLOBULAIRES DES 36 GENISSES ETUDIEES (VILLARS)

23 - 3 - 65

(Prise d'essai : 0,05 ml)

Numéros des animaux	Méthode manométrique		Méthode colorimétrique W.E. ROBBINS	Méthode électrométrique Δ pH 30 minutes
	μ l CO ₂ en 30 minutes	μ moles de substrat hydrolysées en 30 minutes		
Bg 1	124	5,5	5,3	1,10
Bg 2	173	7,7	6,6	1,39
Bg 3	115	5,1	5,3	1,08
Bg 4	110	4,9	5,0	0,74
Bg 5	104	4,6	4,4	0,82
Bg 6	145	6,5	6,0	1,10
Bg 7	135	6,0	5,5	1,02
Bg 8	110	4,9	5,1	0,90
Bg 9	151	6,7	5,9	1,42
Bg 10	155,5	6,9	6,2	1,23
Bg 11	151,5	6,75	6,2	1,33
Bg 12	133,5	5,9	5,6	1,10
Bd 1	142	6,3	5,4	1,04
Bd 2	116	5,2	5,2	0,90
Bd 3	119	5,3	5,4	1,06
Bd 4	156	6,9	6,3	1,04
Bd 5	120	5,35	5,0	0,95
Bd 6	177	7,9	7,0	1,13
Bd 7	125,5	5,5	5,5	0,93
Bd 8	110	4,9	5,2	1,06
Bd 9	148	6,6	6,0	1,21
Bd 10	122	5,4	5,0	0,99
Bd 11	127	5,6	5,2	1,20
Bd 12	100	4,4	4,4	0,80
H 1	128,5	5,7	5,2	0,98
H 2	159	7,1	6,5	1,12
H 3	144,5	6,4	5,8	1,14
H 4	138	6,2	5,5	1,12
H 5	109,5	4,9	4,9	0,98
H 6	125,5	5,6	4,9	1,09
H 7	149,5	6,7	6,3	1,33
H 8	101	4,5	4,5	0,94
H 9	145	6,5	6,0	1,31
H 10	109	4,9	4,8	0,90
H 11	167,5	7,5	6,8	1,47
H 12	142,5	6,4	5,7	1,10
Moyenne	134	5,9	5,4	1,08
<u>CHOLINESTERASES PLASMATIQUES</u>				
Bg 6	5	0,22	0,21	
Bg 7	2,5	0,09	0	
Moyenne	3,5	0,15	0,1	

Le rapport moyen $\frac{\text{cholinestérase globulaire}}{\text{plasmatique}}$ est de : 45,8

VII - MOUTONS

Les cholinestérases de 4 sangs de mouton prélevés à l'abattoir ont été dosées selon les techniques manométriques et colorimétriques selon W.E. ROBBINS et selon D. VINCENT. Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Solution enzymatique	Numéros	Méthode manométrique	Méthodes colorimétriques		
Prise d'essai : 0,05 ml		$\mu\text{l CO}_2$ en 30 mn	μ moles d'acétylcholine hydrolysées en 30 minutes	W.E. ROBBINS	D. VINCENT
Globules rouges	1	44,5	2,0	1,5	1,7
" "	2	62	2,8	2,0	2,3
" "	3	71,5	3,1	2,5	2,6
" "	4	52	2,4	2,1	1,9
Plasma	1	2	0,1	0	0
" "	2	1	0,05	0	0
" "	3	7,5	0,3	0,05	0
" "	4	7,5	0,3	0	0
Moyenne globules rouges		52,5	2,6	2,0	2,1
Moyenne Plasma		4,5	0,2	0	0

Le rapport moyen $\frac{\text{cholinestérase globulaire}}{\text{plasmatique}}$ est de 13, rapporté aux déterminations manométriques. Il n'a plus de sens si l'on tient compte des mesures colorimétriques qui sont trop peu sensibles pour le dosage dans le plasma.

VIII - CHEVRES

2 sangs de chèvres ont été prélevés à l'abattoir.

Nous obtenons les résultats suivants :

Prise d'essai : 0,05 ml	Numéros	Méthode manométrique		Méthode colorimétrique W.E. ROBBINS
		$\mu\text{l CO}_2$ en 30 mn	μ moles acétylcholine hydrolysées en 30 minutes	
Globules rouges	1	83	3,7	3,4
" "	2	79,5	3,5	3,2
Plasma	1	6,5	0,3	0,4
"	2	4	0,15	0,3
Moyenne globules rouges		81,5	3,6	3,3
" plasma		5	0,2	0,35

Le rapport moyen $\frac{\text{cholinestérase globulaire}}{\text{" plasmatique}}$ est de 11,5

IX - PORC

Mêmes prélèvements et mêmes techniques que pour les sangs de mouton.
Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Solution enzymatique Prise d'essai (0,05 ml)	Numéros	Méthode manométrique		Méthodes colorimétriques	
		$\mu\text{l CO}_2$ en 30 mn	μ moles de substrat hydrolysées en 30 minutes	W.E. ROBBINS	D. VINCENT
Globules rouges	1	98	4,3	3,1	4,6
" "	2	88,5	3,9	2,8	3,4
" "	3	86	3,8	2,4	2,9
" "	4	77,5	3,5	2,7	3,1
Plasma	1	16	0,7	0,2	0,7
" "	2	13	0,6	0,15	0,6
" "	3	11	0,5	0,15	0,3
" "	4	15	0,7	0,3	0,7
Moyenne globules rouges		87,5	3,9	2,8	3,5
Moyenne plasma		14	0,6	0,2	0,6

Le rapport moyen $\frac{\text{cholinestérase globulaire}}{\text{plasmatiche}}$ est de 6,8

X - LAPIN

Un seul prélèvement a été réalisé sur un lapin par ponction intracardiaque.
Nous obtenons les résultats suivants :

Prise d'essai 0,05 ml	Méthode manométrique		Méthode colorimétrique W.E. ROBBINS
	$\mu\text{l CO}_2$ en 30 mn	μ moles acétylcholine hydrolysées en 30 minutes	
Globules rouges	37	1,65	1,5
Plasma	22,5	1,0	1,1

Le rapport $\frac{\text{cholinestérase globulaire}}{\text{plasmatiche}}$ est de 1,4

XI - POULETS

Nous avons réalisé des déterminations de cholinestérases globulaires et plasmatiques chez deux séries d'animaux.

- 1) poulets d'élevage âgés de 8 semaines
- 2) poules de 1 à 2 ans

Tous sont des poulets de Bresse, élevés dans la région de CHALON sur SAONE.

1) Poulets d'élevage de 8 semaines.

Prise d'essai	Numéros	Méthode manométrique		Méthode colorimétrique W.E. ROBBINS
		$\mu l CO_2$ en 30 mn	μ moles d'acétylcholine hydrolysées en 30 minutes	
Globules rouges	1	6,5	0,3	0,1
" "	2	6,5	0,3	0,2
" "	3	4,5	0,2	0,3
" "	4	5,5	0,25	0,15
Plasma	1	21,5	0,95	0,7
"	2	13	0,6	0,6
"	3	27	1,2	1
"	4	33,5	1,5	1,3
Moyenne globules rouges		5,7	0,25	0,2
" plasma		23,5	1,05	0,9

2) Poules de 1 à 2 ans

Globules rouges	1	3,5	0,1	0,07
" "	2	3	0,1	0,07
" "	3	3,5	0,1	0,07
" "	4	4,5	0,2	0,09
Plasma	1	38	1,7	1,45
"	2	28,5	1,3	1,25
"	3	30,5	1,35	1,4
"	4	16,5	0,7	0,65
Moyenne globules rouges		3,8	0,12	0,075
" plasma		28	1,25	1,2

Le rapport moyen $\frac{\text{cholinestérase globulaire}}{\text{plasmatique}}$ est de 0,14

XII - TABLEAU RECAPITULATIF

Espèces animales	Méthode manométrique		Méthodes colorimétriques		Moyenne
			W.E. ROBBINS D. VINCENT		
	$\mu\text{l CO}_2$ en 30 mn	μ moles d'acétylcholine hydrolysées en 30 minutes			
		pour une prise d'essai de 0,05 ml de globules rouges ou de plasma			
<u>I - Globules rouges</u>					
Homme	261,5	11,6	11,2	10,8	11,2
Singe	221,5	9,8	8,8		9,3
Chien	40	1,75	1,85		1,8
Chat	27	1,2	1,0		1,1
Cheval	65,5	2,9	3,1		3,0
Vache adulte	180,5	7,7	7,8		7,75
Génisse (Villars)	134	5,9	5,4	5,1	5,5
Mouton	52,5	2,6	2,0	2,1	2,2
Chèvre	81	3,6	3,3		3,45
Porc	87,5	3,9	2,8	3,5	3,4
Lapin	37	1,65	1,5		1,55
Poulet	4,7	0,18	0,14		0,16
<u>II - Plasma</u>					
Homme	93,5	4,2	3,9	4,2	4,1
Singe	12	0,55	0,3		0,42
Chien	45	2,0	1,7		1,85
Chat	65	2,9	2,3		2,6
Cheval	90,5	4,0	3,1		3,55
Vache adulte	2,7	0,1	0,1		0,1
Génisse (Villars)	3,5	0,15	0,1		0,12
Mouton	4,5	0,2	≈ 0	0	0,1
Chèvre	5,5	0,25	0,35		0,3
Porc	14	0,6	0,2	0,6	0,5
Lapin	23	1,0	1,1		1,05
Poulet	25,5	1,15	1,05		1,1

XIII - CONCLUSIONS DE CETTE SERIE DE DETERMINATIONS

Nous pouvons d'après le tableau précédent classer les espèces étudiées d'après leurs taux de cholinestérases globulaire et plasmatique.

Cholinestérase globulaire			Cholinestérase plasmatique		
µ moles acétylcholine/30 mn			µ moles acétylcholine/30 mn		
Homme	11,2	"	Homme	4,1	"
Singe	9,3	"	Cheval	3,55	"
Boeuf	7,75	"	Chat	2,6	"
Génisse	5,5	"	Chien	1,85	"
Chèvre	3,45	"	Poulet	1,1	"
Porc	3,4	"	Lapin	1,05	"
Cheval	3,0	"	Porc	0,5	"
Mouton	2,2	"	Singe	0,42	"
Chien	1,8	"	Chèvre	0,3	"
Lapin	1,55	"	Génisse	0,12	"
Chat	1,1	"	Boeuf	0,1	"
Poulet	0,16	"	Mouton	0,1	"

Ce classement diffère quelque peu de celui donné par Y. RUCKEBUSCH et M. RUCKEBUSCH (94) qui avaient réalisé les mêmes dosages mais au moyen de la méthode électrométrique qui se prête moins bien à une évaluation quantitative des cholinestérases.

Cholinestérase globulaire	Cholinestérase plasmatique
(dans l'ordre décroissant)	
Porc	Chien
Mouton	Cheval
Vache	Lapin
Chien	Volaille
Cheval	Porc
Chèvre	Mouton
Lapin	Vache
Volaille	Chèvre

Mais nous remarquons que parfois les écarts observés entre 2 espèces animales sont faibles. Compte tenu des variations individuelles qui sont parfois assez grandes, le classement donné plus haut n'a rien d'absolu.

A la fin de chaque série de dosages sur un animal, nous avons donné la valeur du rapport Cholinestérase globulaire
" plasmatique

Nous aurions pu calculer le rapport inverse, mais les chiffres obtenus pour les bovidés auraient été alors très faibles. Nous allons donner le classement des animaux d'après les valeurs décroissantes du rapport cholinestérase globulaire

" plasmatique
calculée d'après la moyenne des résultats obtenus d'après les différentes méthodes de dosage utilisées

Boeuf	77,5
Génisse	45,8
Singe	17,8
Mouton	13 (méthode manométrique)
Chèvre	11,5
Porc	6,8
Homme	2,7
Lapin	1,4

Chien	0,97
Cheval	0,84
Chat	0,42
Poulet	0,14

Nous devons maintenant tirer des conclusions à partir des classements précédents.

Dans les globules rouges, la teneur en enzyme est très forte chez l'homme, plus faible chez les Ruminants, Equidés et Porcins, très faible chez le lapin et les Carnivores étudiés et insignifiante chez le poulet.

Par contre dans le plasma, le taux de pseudocholinestérase est élevé chez l'homme, les Equidés et les Carnivores étudiés. Il est faible chez le lapin, le poulet, le singe et le porc, insignifiant chez les Ruminants. Ce dernier fait ne fait que confirmer de très nombreuses observations.

Le rapport cholinestérase globulaire
" plasmatique

nous permet de classer les animaux en 2 séries :

1) ceux où ce rapport est supérieur à 1. Le taux de la cholinestérase globulaire est supérieur à celui de la pseudocholinestérase plasmatique. Chez les Ruminants, la valeur du rapport est élevée, ainsi que chez le singe, ce qui correspond à une teneur enzymatique assez forte dans les globules et insignifiante dans le plasma.

2) ceux où ce rapport est inférieur à 1. Le taux de cholinestérase globulaire est généralement faible et le plasma montre une activité enzymatique supérieure à celle des globules rouges. Nous trouvons dans ce groupe les Carnivores étudiés, ainsi que le cheval et le poulet. A propos du chat et du poulet, MENDELL et ses collaborateurs (77) avaient signalé que le faible taux de cholinestérase globulaire était compensé par la présence dans le plasma d'une certaine proportion de cholinestérase "vraie".

Au point de vue toxicologique, plus la teneur en cholinestérase globulaire chez un sujet normal est élevée, plus il sera facile de se rendre compte avec précision d'une éventuelle inhibition. Chez le poulet, le taux de cholinestérase globulaire est tellement faible qu'il apparaît presque impossible de porter un diagnostic d'intoxication par des composés anticholinestérasiques en ne réalisant que le dosage enzymatique classique.

Contrairement à ce que nous avons pensé en entreprenant cette étude, il ne semble pas possible d'établir un rapport entre le taux de pseudocholinestérase plasmatique d'un animal et son genre de vie.

Si nous reprenons le tableau récapitulatif précédent, nous remarquons que la méthode colorimétrique de W.E. ROBBINS qui donne d'excellents résultats chez l'homme et les bovidés, se révèle beaucoup moins satisfaisante chez d'autres espèces animales : mouton, porc, singe, plasmas de cheval et de chat. Pour ces derniers, nous avons par la réalisation d'un témoin sans acétylcholine décelé une réaction du plasma avec l'hydroxylamine et les valeurs figurant dans notre tableau tiennent compte de cette correction. Mais ce fait n'est peut être pas la seule explication.

TROISIEME PARTIE

EXPERIMENTATION DE QUELQUES COMPOSES ORGANOPHOSPHORES

UTILISES DANS LA LUTTE CONTRE LE VARRON.

Cette expérimentation a été réalisée en grande partie sur les bovidés de la ferme du Centre Technique du Cuir à Villars les Dombes. Aussi nous adressons tous nos remerciements à Monsieur le Professeur TAPERNOUX qui nous a donné l'autorisation d'effectuer cette série d'expériences, et à Monsieur le Professeur MAGAT qui a effectué les applications des produits et les prises de sang nécessaires aux dosages.

D'autre part au laboratoire de Monsieur le Professeur CHAMBON, nous avons essayé deux produits organophosphorés sur le chien. Nous exposerons d'abord les résultats de cette expérimentation. Puis nous détaillerons la série d'essais réalisée chez les bovidés.

I - Essais chez le chien.

Nous avons utilisé 2 animaux. Les produits ont été employés selon la méthode "Pour-On" (47) appliquée pour le traitement des bovins contre le varron. Mais l'épaisseur des poils du chien risquant de retenir le produit, nous avons au préalable rasé le dos et les flancs de l'animal.

La formule utilisée a été la suivante :

Organophosphoré Q.S.	(selon le produit, la dose utilisée et le poids de l'animal)
H ₂ O	15 ml.
Huile d'arachide	5 ml
Nonylphénol polyoxyéthylène glycol	0,05 g.

Agiter jusqu'à obtention d'une émulsion stable. L'huile et le produit émulsifiant ont pour but de faciliter la pénétration du produit à travers la peau.

La solution est appliquée sur le dos de l'animal à l'aide d'un coton hydrophile tenu avec une pince afin d'éviter le contact avec l'organophosphoré. On passe le coton en l'exprimant sur la peau. Au cours de cette opération, on doit essayer d'éviter les pertes de liquide.

Une prise de sang a été effectuée avant l'application du produit. On réalise plusieurs traitements espacés par un laps de temps de 3 jours. Il est fait une prise de sang 24 heures après chaque application d'organophosphoré.

Expérience N° 1.

Le Rogor ou Diméthoate (thiophosphate de diméthyle et de mercaptométhylcarbamate de N méthyle) a été appliqué à la dose de 15 mg/Kg. Le chien pesait 13,5 Kg et nous avons donc dissous dans l'eau 205 mg de produit. Trois traitements successifs ont été réalisés avec des concentrations identiques d'organophosphoré.

Les dosages de cholinestérases ont été réalisés sur les globules rouges et le plasma. Nous n'avons pas pu effectuer de dosage sur sang total vu la faible quantité obtenue à chaque prélèvement. Les déterminations ont été réalisées à 25° et donnent les résultats suivants :

Prise d'essai 0,05 ml	Diméthoate (Rogor) 15 mg/Kg "Pour On"						% moyen de baisse
	Méthode manométrique				Méthode colorimétrique		
	μ l CO ₂ en 30 mn	% baisse	μ moles substrat / 30 mn	% baisse	W.E. ROBBINS μ moles substrat / 30 mn	% baisse	
Globules rouges							
avant traitement	41		1,8		1,9		
1er "	30,5	25,5	1,4	22,0	1,2	36,5	28
2ème "	26	36,5	1,1	39,0	1,1	42,0	39,2
3ème "	32,5	20,5	1,4	22,0	1,4	26,5	23
Plasma							
avant traitement	25		1,1		1,1		
1er "	23	8,0	1,0	9,0	1,0	9,0	8,7
2ème "	20,5	18,0	0,9	18,0	0,8	27,0	21
3ème "	30	+ 20,0	1,3	+ 18,0	0,9	18,0	+ 6,6

Nous constatons qu'à la 1ère application, la cholinestérase globulaire est déjà abaissée dans une proportion notable. L'enzyme plasmatique ne subit pas de modification bien caractéristique.

Le 2ème traitement abaisse nettement les cholinestérases aussi bien globulaires que plasmatiques.

Par contre, malgré la 3ème application du produit, on constate un relèvement général du taux des enzymes. La teneur du plasma est même plus élevée qu'avant traitement. Ce fait peut sembler paradoxal et montrerait l'apparition d'une accoutumance du chien à l'organophosphoré.

Dans tous les cas, l'abaissement maximum n'excède pas 40 % et à aucun moment le chien n'a présenté de symptômes d'intoxication.

Expérience N° 2.

Le Trichlorfon (trichlo 2,2,2 hydroxy 1 éthyl phosphonate de diméthyle) a été appliqué à la dose de 20 mg/Kg. Le chien pesait 12,2 Kg. et nous avons dissous 260 mg de produit dans la quantité d'eau nécessaire.

Afin de tenter d'obtenir une confirmation du relèvement du taux d'enzyme à la 3ème application, nous avons réalisé cette fois 4 traitements successifs, toujours à la même dose et à 3 jours d'intervalle. Cependant pour des raisons de commodité, 2 jours seulement se sont écoulés entre la 3ème et 4ème application.

Les déterminations ont été réalisées à 37° et donnent les résultats suivants :

Trichlorfon 20 mg/Kg "Pour On"							% moyen de baisse
Solution enzymatique Prise d'essai 0,05 ml	Méthode manométrique				Méthode colorimétrique		
	$\mu l CO_2$ en 30 mn	% baisse	μ moles substrat /30 mn	% baisse	W.E. ROBBINS μ moles substrat / 30 mn	% baisse	
I - Globules rouges							
avant traitement	39		1,7		1,8		
1er "	37	5	1,65	3	1,7	5,5	4,5
2ème "	30,5	21,5	1,35	20,5	1,2	33	26,3
3ème "	36	7,5	1,6	6	1,45	19,5	11
4ème "	35	10	1,55	9	1,45	19,5	12,8
II - Plasma							
avant traitement	65		2,9		2,3		
1er "	56	14	2,5	14	2,0	13	13,7
2ème "	50,5	22,5	2,2	24	1,9	17,5	22,3
3ème "	47,5	27	2,1	27,5	2,0	13	22,3
4ème "	63	3	2,8	3,5	2,0	13	6,5

A la 1ère manipulation, l'abaissement des cholinestérases est plus important dans le plasma que dans les globules rouges.

Il devient net à la 2ème application.

Le 3ème traitement montre un relèvement de la cholinestérase globulaire tandis que la plasmatique demeure abaissée.

Elle ne se relève qu'après la 4ème application. Celle-ci semblerait montrer un nouvel abaissement de l'enzyme globulaire, mais celui-ci est faible et par conséquent non significatif.

L'abaissement maximum est ici d'environ 25 %, donc plus faible qu'avec le Rogor. Le pouvoir anticholinestérasique du Trichlorfon serait donc moins important. Bien entendu le chien n'a pas présenté de symptômes d'intoxication.

D'autre part nous constatons que la 3ème application de Rogor montre un relèvement du taux des enzymes, aussi bien globulaire que plasmatique. Par contre avec le Trichlorfon, l'enzyme globulaire se reconstitue avant l'enzyme plasmatique. Les deux produits se comportent donc différemment.

Les deux organophosphorés expérimentés n'ont donc pas un pouvoir anticholinestérasique très important chez le chien. Il est possible que ce fait soit dû à une mauvaise pénétration du produit à travers la peau, soit à une destruction de l'organophosphoré par des systèmes enzymatiques. Ceux-ci partiellement inhibés après la 1ère application, recouvreraient ensuite toute leur activité et détruiraient les composés organophosphorés introduits ultérieurement dans l'organisme du chien.

II - Essais sur les bovidés

Ces essais ont été réalisés à la ferme expérimentale du Centre Technique du Cuir à Villars les Dombes sur des génisses de race normande, achetées en Normandie, région où l'hypodermose sévit avec une grande intensité. Leur âge est compris entre 12 et 18 mois et leur poids moyen est de 300 à 350 Kg.

Ces animaux sont utilisés par le Centre Technique du Cuir pour expérimenter des préparations de produits destinés à la lutte contre le varron. Ils passent tout l'hiver à l'étable et reçoivent comme nourriture du foin et une farine ali-

mentaire, composées de céréales, de mélasse et de tourteaux d'arachide et de soja. Ils ne reçoivent aucun médicament en dehors des produits d'expérience.

I) - essais de produits organophosphorés destinés à la lutte contre le varron, sur les 36 animaux de Villars les Dombes.

Ces animaux sont répartis en 3 séries de 12, désignées par les lettres H, Bg et Bd. Un numéro d'ordre est affecté à chacun.

Ces expériences ont été réalisées par Monsieur le Professeur MAGAT. Nous les indiquons ici, car elles font partie de la série d'essais sur le pouvoir anticholinestérasique des produits essayés. Nous exposerons aussi les résultats obtenus dans le traitement contre le varron.

Entre le 12 et le 18 décembre 1964, les animaux ont été traités par différents produits. Les uns sont des organophosphorés, les autres des antiparasitaires non organophosphorés. Le traitement a été unique. La dose et le mode d'administration sont variables selon le composé utilisé, et sont indiqués dans le tableau qui suit :

Animal	Médicament et dose	Nombre de varrons en avril 1965
H 1	Rogor (Diméthoate) pur par voie percutanée en solution dans l'acétate de cellosolve - 30 mg/kg	0
H 7	-d°-	19
BG 3	Rogor (Diméthoate) technique par voie percutanée en solution dans le diméthylsulfoxyde	7
BG 10	-d°-	0
H 2	Trichlorfon par voie percutanée 20 mg/kg et Contrathion	0
H 9	-d°-	0
BG 9	-d°-	0
BG 10	-d°-	0
H 8	Rogor (Diméthoate) injection sous-cutanée Solution diméthylsulfoxyde-eau 20 mg/kg	0
BG 6	-d°-	0
BG 7	-d°-	0
BD 2	-d°-	0
BD 4	-d°-	0
BD 8	-d°-	1
BD 9	-d°-	0
BD 11	-d°-	0
H 6	Témoin	48
BG 12	Témoin	20
BD 7	Témoin	5
BD 12	Témoin	27

Tableau résumant l'activité des produits essayés vis à vis des larves d'hypo-derme.

Produit utilisé	Nombre moyen de varrons	Activité du produit (par rapport aux témoins)
Témoins	25	
Rogor (Diméthoate) (cellosolve)	9,5	62 %
" (diméthyl- (sulfoxyde)	3,5	86 %
Trichlorfon	0	100 %
Diméthoate injectable	0,13	99,5 %

Le 23 mars 65, soit un peu plus de 3 mois après le traitement, une prise de sang a été faite à tous les animaux. Sur les globules rouges séparés par centrifugation, nous avons réalisé un dosage de cholinestérases par les méthodes manométrique de K.B. AUGUSTINSON et colorimétrique de W.E. ROBBINS. En même temps, un dosage selon la méthode électrométrique était effectué au laboratoire de Monsieur le Professeur MAGAT à l'Ecole Vétérinaire.

Les résultats de ces déterminations ont été donnés plus haut lors de l'exposé concernant le taux normal des cholinestérases chez les diverses espèces animales. (page 97) Ils permettent de constater que le sang des animaux témoins ne contient pas plus de cholinestérase que ceux qui ont été traités. Ce qui prouverait qu'au bout de 3 mois, la régénération de l'enzyme est totale.

Le 5 avril 65, le compte des varrons a été effectué sur le dos de tous les animaux. Les résultats sont exposés dans le tableau précédent et appellent les commentaires suivants :

Les témoins présentent un nombre important de varrons. L'activité des composés organophosphorés essayés est variable.

Le Trichlorfon par voie percutanée donne un résultat de 100 %.

Le Rogor (Diméthoate) injectable est également très actif contre le varron.

L'efficacité du même composé appliqué par la méthode Pour-On est moindre.

Il n'a pas été possible de déterminer le pouvoir anticholinestérasique des produits expérimentés au moment du traitement. Aussi nous avons entrepris une série d'expériences dans ce but.

2) essai du pouvoir anticholinestérasique du Trichlorfon à dose thérapeutique

(20 mg/Kg)

Sur 2 génisses (Bg 6 et Bg 7), nous avons appliqué selon la méthode "Pour-On" une préparation à base de Trichlorfon, à la dose de 20 mg/Kg. La formule était la suivante :

Trichlorfon 21 g

Ethylglycol 21 g

Emullat 29 60 g

Huile de pin q.s.p. 100 ml

Ce mélange est dilué au 1/6 avec de l'eau au moment de l'emploi. Il est appliqué à raison de 60 ml de solution par 100 Kg de poids vif.

L'émullat 29 est un mouillant non ionique résultant de la condensation de l'oxyde d'éthylène sur un alkylphénol. Il a pour but, ainsi que l'éthylglycol, de faciliter la pénétration de l'organophosphoré à travers le cuir.

Une prise de sang avait été réalisée avant l'application de la préparation. Puis les prélèvements ont été effectués 1 h., 7 h., 24, 48 et 72 heures après

traitement. Sur chaque échantillon de sang, les dosages ont été réalisés selon les mêmes méthodes que précédemment. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant.

BOVINS VILLARS 20.3.55
APPLICATION D'UNE DOSE UNIQUE DE TRICHLORFON A 20 mg/kg
PAR VOIE PERCUTANEE
TAUX de CHOLINESTERASE GLOBULAIRE : (Prise d'essai : 0,05 ml)

ANIMAL Bg 6	METHODE MANOMETRIQUE				METHODES COLORIMETRIQUES				METHODE ELECTROMETRIQUE	
	µl CO ₂ /30 mn	% baisse	µ moles substrat /30 mn	% baisse	W.E. ROBBINS µ moles substrat /30 mn	% baisse	S. CHARONNAT µ moles substrat / 30 mn	% baisse	Δ pH/ 30 mn	% baisse
Avant traitement										
20.3. 11 h.30	145		6,5		6,0		6,0		1,10	
1 h. après										
20.3. 12 h.30	144	0,7	6,4	1,5	5,6	6,6	5,9	1,6	1,02	7,3
7 h. après										
20.3. 18 h.30	127	12,5	5,6	13,8	5,1	15,0	5,2	13,3	1,01	8,2
24 h. après										
21.3. 11 h.30	114	21,4	5,1	21,5	4,5	25,0	4,6	23,3	0,94	14,5
48 h. après										
22.3.	111	23,7	4,9	24,6	4,9	18,3	4,5	25	1,01	8,2
72 h. après										
23.3.	125	13,8	5,6	13,8	5,0	16,7	4,2	30	1,00	9,1
ANIMAL Bg 7										
Avant traitement	135		6,0		5,5		5,4		1,02	
1 h. après	127	5,9	5,6	6,6	5,1	7,3	5,2	3,7	0,86	15,7
7 h. après	120	11,1	5,35	10,8	4,5	18,2	4,8	11,1	0,96	5,9
24 h. après	118,5	12,2	5,3	11,7	4,4	20,0	4,7	12,9	0,90	11,8
48 h. après	105	22,2	4,7	21,7	4,7	14,5	4,2	22,2	0,99	2,9
72 h. après	133	1,5	5,9	1,7	5,0	9,1	3,5	35,1	0,90	11,8

1 h. après 5,7
7 h. après 12
24 h. après 17,5
48 h. après 18,3
72 h. après 14,3

% moyen de baisse :

Au bout d'une heure, l'abaissement de la cholinestérase globulaire est faible et non significatif. Il est déjà plus net 7 heures après le traitement. Le taux d'enzyme diminue encore et atteint sa valeur la plus basse 24 heures après l'application de l'organophosphoré et s'y maintient encore après 48 heures. A partir de ce moment, on constate une légère remontée du taux de l'enzyme.

De toute façon, l'abaissement maximum de la cholinestérase globulaire sous l'action de l'organophosphoré n'atteint pas 20 %. On ne risque donc pas de voir apparaître de symptômes d'intoxication. A la dose de 20 mg/Kg, le Trichlorfon se révèle donc un anticholinestérasique très faible.

3) essai du pouvoir anticholinestérasique du Trichlorfon à la dose de 40 mg/Kg.

Pour compléter l'expérience précédente, nous avons appliqué à 2 animaux (H 11 et H 12) le Trichlorfon à la dose de 40 mg/Kg. Pour ce, nous avons dilué la formule précédente au 1/3 et non pas au 1/6.

Les prises de sang ont été effectuées avant traitement, 3 et 24 heures après. Les résultats des dosages, toujours effectués selon les mêmes techniques, sont rassemblés dans le tableau suivant :

ANIMAL H 11	Méthode manométrique				Méthode colorimétrique		Méthode électrométrique	
	$\mu\text{l CO}_2$ /30 mn	% baisse	μ moles substrat / 30 mn	% baisse	W.E. ROBBINS μ moles sub- strat/30 mn	% baisse	Δ pH/ 30 mn.	% baisse
Avant traitement								
5.4. 14 h.30	176		7,8		7,1		1,47	
3 h. après								
5.4. 17 h.30	159,5	9,3	7,1	8,9	6,2	12,5	1,12	23,8
24 h. après								
6.4. 14 h.30	114	35,2	5,1	34,6	5,2	26,8	0,69	53,0
ANIMAL H 12								
Avant traitement	164,5		7,3		6,4		1,16	
3 h. après	149	9,4	6,6	9,6	5,8	9,5	1,04	10,3
24 h. après	95,5	41,9	4,3	41,1	4,3	32,8	0,75	35,3

% moyen de baisse 3 h. après : 11,6
 24 h. après : 41,3

3 heures après l'application, le taux d'abaissement des cholinestérases est faible, mais net. Après 24 heures, nous constatons une diminution de l'enzyme globulaire de l'ordre de 40 %, soit un peu plus de 2 fois que celle obtenue à la dose thérapeutique.

Huit jours après, un dosage de cholinestérase a été réalisé au laboratoire de Monsieur le Professeur MAGAT par la méthode électrométrique. Il permet de constater qu'il n'y a alors aucune remontée du taux de l'enzyme.

A la dose de 40 mg/Kg, le Trichlorfon se révèle posséder des propriétés anticholinestérasiques assez importantes. Bien que les animaux n'aient pas présenté de symptômes d'intoxication, il semble que l'emploi de cette dose ne soit pas recommandable.

4) essai du pouvoir anticholinestérasique de doses répétées de Trichlorfon.

Nous avons utilisé le même protocole expérimental que pour le chien : 3 applications de Trichlorfon à la dose thérapeutique de 20 mg/Kg, à intervalles de 3 jours. Les prises de sang ont été effectuées avant traitement, et 24 heures après chaque application. Les résultats des dosages, toujours effectués selon les mêmes techniques, sont rassemblés dans le tableau suivant :

Doses répétées Trichlorfon 20 mg/Kg voie percutanée.

Application à intervalles de 72 h. les 5.4.; 8.4. et 11.4.65.

Prise de sang 24 h. après l'application.

Prise d'essai de globules rouges : 0,05 ml

ANIMAL H 6	METHODE MANOMETRIQUE				METHODE COLORIMETRIQUE		METHODE ELECTROMETRIQUE	
	$\mu\text{l CO}_2$ baisse	% baisse	μ moles substrat / 30 mn	% baisse	W.E. ROBBINS μ moles substrat /30 mn	% baisse	Δ pH/ 30 mn	% baisse
Avant traitement 5.4.	136		6,1		5,8		1,00	
Après 1er traitement 6.4.	110	19,1	4,9	19,7	4,9	15,5	0,84	16,0
Après 2e traitement 9.4.	93,5	31,2	4,2	31,1	4,5	22,4	0,74	26,0
Après 3e traitement 12.4.	88	35,3	3,9	36,0	4,3	25,8	0,53	47,0
ANIMAL H 10								
5.4.	125		5,6		5,1		0,94	
6.4.	103,5	17,2	4,6	17,8	4,4	13,7	0,69	26,6
9.4.	75,5	39,6	3,4	39,3	3,6	29,4	0,55	41,5
12.4.	77,5	38,0	3,5	37,5	3,2	37,2	0,39	58,5

	après 1° traitement : 17,3 %
% moyen de baisse	après 2° traitement : 32,5 %
	après 3° traitement : 38 %

Les résultats obtenus sont différents de ceux résultant de l'expérimentation chez le chien.

Nous retrouvons pour le 1er traitement le taux d'abaissement obtenu lors de la 1ère expérience avec le Trichlorfon à dose unique. La seconde application montre une diminution sensible des cholinestérasas. Et contrairement à ce que nous avons constaté chez le chien, le taux d'enzyme diminue encore après la 3ème application.

Un dosage réalisé par méthode électrométrique sur un prélèvement effectué 48 h. après le dernier traitement montre une très légère remontée du taux des cholinestérasas.

Il en résulte

- a) que le pouvoir anticholinestérasique du Trichlorfon à dose égale, est plus élevé chez le boeuf que chez le chien.
- b) qu'il n'y a pas d'apparition d'accoutumance au produit après la 3ème application chez le boeuf. Cet animal serait donc plus sensible à l'action du Trichlorfon que le chien. Malgré ce fait, nous n'avons pas constaté de symptômes d'intoxication chez les 2 animaux traités.

Nous joignons à ces deux dernières expériences le tableau des dosages réalisés par méthode électrométrique à l'Ecole Vétérinaire, et qui nous a été communiqué par Monsieur le Professeur MAGAT :

CHOLINESTERASES GLOBULAIRES. DOSAGE PAR LA
METHODE ELECTROMETRIQUE

Génisses Villars. Expériences du 5 au 13 avril 1965

Animaux		H 6	H 10	H 11	H 12
Prélèvements		Variation de pH (en unités pH) pour 30 minutes d'hydrolyse du substrat			
Jour	Heure				
5/4/65	14 h.	1,00	0,94	1,47	1,16
5/4/65	14 h.15	Application du Trichlorfon (dose thérapeutique)		Application du Trichlorfon (dose thérapeutique x 2)	
5/4/65	17 h.15	---	---	1,12	1,04
6/4/65	17 h.15	0,84	0,69	0,69	0,75
8/4/65	17 h.	Application du Trichlorfon (dose thérapeutique)		---	---
9/4/65	17 h.	0,74	0,55	---	---
11/4/65	17 h.	Application du Trichlorfon (dose thérapeutique)		---	---
12/4/65	17 h.	0,53	0,39	---	---
13/4/65	14 h.	0,57	0,48	0,56	0,78

5) Action des antidotes (atropine et contrathion), injectés 24 heures après
l'application d'une dose de Trichlorfon de 40 mg/kg.

Le 8.6.55 à 15 heures, une prise de sang témoin est faite à 4 génisses. Aussitôt après, on leur applique comme pour l'expérience du paragraphe 3 une dose de Trichlorfon de 40 mg/kg, par voie percutanée.

Le 9.6.65 à 16 heures, on fait aux 4 animaux une prise de sang et on applique ainsi les antidotes, injectés par voie sous-cutanée.

- animal 1 : pas d'antidote
" 2 : atropine 30 mg
" 3 : contrathion 2g
" 4 : atropine + contrathion aux doses précédentes.

Puis des prises de sang sont effectuées les

10.6.65 à 13 heures

11.6.65 à 11 heures

12.6.65 à 11 heures

14.6.65 à 17 heures 30

Sur tous les échantillons, nous avons effectué la détermination des cholinestérases selon les méthodes manométriques selon K.B. AUGUSTINSON et colorimétriques selon W.E. ROBBINS et D. VINCENT, avec et sans Diparcol.

Nous avons également réalisé cette dernière méthode sur sang total, mais les résultats obtenus sont parfois aberrants et nous ne pouvons pas les prendre en considération. Ceci résulte très probablement de la prise d'essai de 0,02 ml qui est très faible. Nous en avons parlé lors de l'exposé comparatif des diverses techniques colorimétriques.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant :

BOVINS VILLARS 8.6.65
APPLICATION TRICHLORFON 40 mg/kg
 (voie percutanée)
CHOLINESTERASES GLOBULAIRES
PRISE D'ESSAI : 0,05 ml

Numéro de l'animal et traitement	Dates	METHODE MANOMETRIQUE				METHODES	
		μ l CO ₂ en 30 mn.	% baisse	μ moles substrat en 30 mn	% baisse	W.E. ROBBINS μ moles substrat /30 mn.	% baisse
1 pas d'antidote	8.6.65	161		7,2		5,8	
	9.6.65	112,5	30	5,0	30,5	4,4	24
	10.6.65	89,5	44,5	4,0	44,5	4,1	29,5
	11.6.65	89,5	44,5	4,0	44,5	4,2	27,5
	12.6.65	92	43	4,1	43	3,9	32,5
	14.6.65	84	47,5	3,7	48,5	3,0	48
2 Atropine 30 mg	8.6.65	100,5		4,4		4,4	
	9.6.65	69	31,5	3,0	31,5	2,9	34
	10.6.65	55	44,5	2,5	43	2,4	45,5
	11.6.65	48	51,5	2,1	52	1,7	61,5
	12.6.65	47,5	52,5	2,1	52	1,7	61,5
	14.6.65	50,5	49,5	2,2	50	1,8	59
3 Contrathion 2 g	8.6.65	128		5,7		4,9	
	9.6.65	105,5	17,5	4,7	17,5	4,0	18,5
	10.6.65	104	18,5	4,6	19,5	4,5	8
	11.6.65	103	19,5	4,6	19,5	4,7	4
	12.6.65	107	16,5	4,8	15,5	4,0	18,5
	14.6.65	106,5	16,5	4,7	17,5	4,4	10
4 Atropine 30 mg + Contrathion 2g	8.6.65	128		5,7		4,9	
	9.6.65	88,5	30,5	3,9	31,5	3,1	36,5
	10.6.65	84	34,5	3,7	35	3,5	28,5
	11.6.65	81	36,5	3,6	37	3,3	32,5
	12.6.65	85	33,5	3,7	35	2,8	43
	14.6.65	76,5	44	3,2	44	2,5	49

BOVINS VILLARS 8.6.65

APPLICATION TRICHLORFON 40 mg/kg

(voie percutanée)

CHOLINESTERASES GLOBULAIRES

PRISE D'ESSAI : 0,05 ml

COLORIMETRIQUES				Moyenne des résultats. μ moles substrat /30 mn.	% baisse moyen
D. VINCENT μ moles substrat / 30 mn.	% baisse	D. VINCENT + Diparcol μ moles sub- strat/30 mn.	% baisse		
6		5,7		6,2	
4,5	25	4,6	19,5	4,6	28
4,1	31,5	3,5	38,5	4,0	35,5
3,7	38,5	3,7	35	3,9	37
3,1	48,5	2,9	49	3,8	38,5
2,2	63,5	1,9	66,5	2,7	56,5
4,7		4,2		4,4	
3,9	17	3,8	7	3,4	22,5
2,4	47	2,4	43	2,4	45,5
3,1	34	3,1	26	2,3	47,5
3,1	34	2,5	40,5	2,2	49,5
1,8	61,5	1,2	71	1,8	59
4,9		4,7		5,3	
4,2	14,5	4,2	10,5	4,3	19
4,1	16,5	4,1	13	4,2	20,5
4,1	16,5	4,1	13	4,3	19
3,5	28,5	4,3	8,5	4,1	22,5
3,3	32,5	3,2	32	3,9	26,5
4,8		4,3		4,7	
3,9	18,5	3,8	11,5	3,7	21,5
2,8	41,5	2,5	41,5	3,3	29,5
3,9	18,5	2,4	44	3,3	29,5
3,6	25	3,1	28	3,1	34
3,1	35,5	1,9	55,5	2,8	40,5

Nous pouvons constater que chez l'animal qui n'a pas reçu d'antidote, ainsi que chez celui auquel il a été injecté de l'atropine, le taux des cholinestérases baisse de façon assez régulière.

Chez l'animal n°3 qui a reçu le Contrathion, il apparaît immédiatement que la baisse de cholinestérase est minime. Cependant en examinant de plus près les résultats obtenus, on est amené à constater que 24 heures après le traitement au Trichlorfon et avant l'administration du Contrathion, cette baisse de taux des cholinestérases était déjà faible : 17 %. Elle persiste à ces mêmes valeurs les jours qui suivent.

On ne peut donc pas tirer de cette expérimentation une conclusion en faveur de l'action du Contrathion, mais plutôt soit à une mauvaise pénétration de l'organophosphoré, soit à une résistance plus grande de l'animal.

Chez l'animal n° 4 qui a reçu à la fois atropine et Contrathion, et qui présente au bout de 24 heures un abaissement de 30 %, on ne voit pas ce chiffre s'élever pendant 4 jours. Cependant au 5^e jour, on assiste à une nouvelle chute du taux des cholinestérases.

On pourrait penser que :

- 1) Le Contrathion n'a pas donné son plein effet immédiatement, n'ayant été administré que 24 heures après l'application de l'organophosphoré.
- 2) son action est restée limitée, puisqu'elle s'est bornée à empêcher la chute du taux des cholinestérases, sans pouvoir les régénérer. Elle s'est épuisée au bout de 4 à 5 jours peut-être par élimination, alors que le Trichlorfon continue à traverser le cuir du boeuf.

Nous ne dissimulons pas que ces conclusions qui portent sur un cas mériteraient d'être étayées sur un plus grand nombre d'expériences.

Les abaisssements obtenus sont variables selon les animaux, mais dans certains cas, ils dépassent 50 % au 6^eme jour après le traitement. Bien que les 4 bovins n'aient pas présenté de symptômes d'intoxication, il se confirme que l'utilisation de la dose de 40 mg/kg présente un risque certain.

Il aurait été intéressant de voir si l'antidote administré en même temps que l'organophosphoré empêchait l'abaissement du taux des cholinestérases. La littérature nous dit que c'est le cas pour les produits de type Parathion.

On peut se demander si l'administration d'un antidote en même temps qu'un organophosphoré destiné à la lutte contre le varron n'empêche pas l'action parasiticide de celui-ci. L'expérience qui a été réalisée par Monsieur le Professeur MAGAT est exposée plus haut. Elle montre que malgré le Contrathion, l'efficacité du Trichlorfon est quand même de 100 %. L'activité du produit organophosphoré est donc respectée.

6) Détermination comparée du pouvoir anticholinestérasique de quelques autres organophosphorés.

Nous avons réalisé l'expérience avec les 3 produits suivants : Parathion, Rogor (Diméthoate), 13.072 R.P.

a) Le Parathion fut utilisé autrefois dans la lutte contre le varron.

Pour déterminer la dose à appliquer, nous nous sommes basés sur la donnée suivante : Le Trichlorfon est employé à 20 mg/kg. Le DL 50 de ce produit est de 600 mg/kg chez le rat. Le rapport est de 1/30. Aussi nous avons adopté comme dose de Parathion le 1/30 de la DL 50 du rat, soit 0,30 mg/kg.

b) Le Rogor ou Diméthoate. Au cours de l'expérimentation réalisée par Monsieur le Professeur MAGAT, qui a été exposée plus haut, ce produit a été utilisé dans la lutte contre le varron, sous une forme injectable qui est la suivante :

Diméthoate pur : 40 g

Diméthylsulfoxyde: 82,5 ml

H₂O, ajoutée au moment de l'emploi : q.s.p. 100 ml

On injecte 5 ml de liquide par 100 kg, soit 20 mg de produit actif par kg. La dose réellement utilisée a été d'environ 15 mg/kg par suite de pertes de liquide au moment de l'injection.

c) Le 13.072 R.P. Ce produit synthétisé par la firme Rhône-Poulenc est récent. Il n'est expérimenté que depuis 2 ans dans la lutte contre le varron. Messieurs les Professeurs TAPERNOUX et MAGAT ont montré que l'efficacité de ce produit est de 100 %. (47). La dose thérapeutique administrée est ici un peu plus élevée : 30 mg/kg. La solution utilisée est préparée par dilution de l'antivarron 13.072 R.P. commercialisé tout récemment par les Laboratoires Roger BELLON sous le nom de SISVAR. La solution - mère est la suivante (formulation Vt 2499)

13.072 R.P. 250 g

Acétophénone 500 ml

Cumène 500 ml

L'expérience a été réalisée sur 1 animal par produit, soit 3 animaux.

Une prise de sang a été effectuée le 10.6.65. L'injection de Rogor et l'application des 2 autres produits selon la méthode "Pour-On" a suivi immédiatement.

Des prises de sang ont été réalisées 24, 48 et 96 h. après aux mêmes dates et heures que pour l'expérience précédente. Les résultats des dosages de cholinestérases sont rassemblés dans le tableau suivant :

ESSAIS DE DIVERS COMPOSES ORGANOPHOSPHORES

Cholinestérase Globulaire
(Prise d'essai : 0,05 ml)

Numéro de l'animal	Date	Méthode manométrique				Méthodes colorimétriques						Moyenne des résultats μ moles substrat /30 mn.	% baisse moyen
		μ l CO ₂ en 30 mn	% baisse	μ moles substrat /30 mn.	% baisse	W.E. ROBBINS μ moles substrat /30 mn.	% baisse	D. VINCENT μ moles substrat /30 mn.	% baisse	D. VINCENT + Diparcol μ moles substrat /30 mn.	% baisse		
5	PARATHION 0,30 mg/kg (1/30 DL 50 du rat) voir percutanée												
	10.6.65	154		6,9		6,7		6,3		5,3		6,5	
	11.6.65	98	36,5	4,3	37,5	3,1	53,5	3,9	38	2,1	60,5	3,0	54
	12.6.65	103	33	4,6	33,5	4,3	36	3,6	43	2,9	45,5	3,7	43
	14.6.65	104	32,5	4,6	33,5	4,5	33	3,0	52,5	2,4	54,5	3,5	46
6	ROGOR (Diméthoate) injectable 15 mg/kg												
	10.6.65	124,5		5,5		5,5		5,3		5,1		5,3	
	11.6.65	50	59,5	2,2	60	1,4	74,5	3,7	30	2,4	53	2,3	56,5
	12.6.65	54,5	56,5	2,4	56,5	1,7	69	2,9	43	?		2,4	54,5
	14.6.65	52,5	58	2,3	58	2,0	63,5	1,8	66	?		2,0	61,5
7	13.072 R.P. 30 mg/kg voie percutanée												
	10.6.65	136		6,0		5,4		5,9		5,3		5,5	
	11.6.65	122	10,5	5,4	10	4,8	11	5,1	13,5	4,7	11,5	5,1	7
	12.6.65	111	18,5	4,9	18,5	4,8	11	3,9	34	3,6	32	4,3	22
	14.6.65	98	28	4,3	28,5	4,2	22	3,4	40,5	2,7	47	3,7	33

Avec le Parathion à la dose de 0,30 mg/kg, le taux de cholinestérases s'abaisse de 40 % environ au bout de 24 heures. Ce qui explique pourquoi ce produit, dangereux à manipuler, n'est plus utilisé dans la lutte contre le varron. D'ailleurs nous l'avons essayé seulement à titre comparatif. Son élimination doit être rapide car on constate dès le 2ème jour une très légère remontée du taux des cholinestérases.

Le Rogor (Diméthoate) injectable à la dose de 15 mg/kg est un inhibiteur puissant des cholinestérases, car dès les premières 24 heures, le taux d'abaissement est aussi élevé et même plus qu'avec le Parathion, mais ce dernier à une dose 50 fois plus faible. Le produit subsiste dans l'organisme de l'animal, car le taux des cholinestérases reste bas, même 96 heures après l'injection. Si le produit administré sous cette forme est actif contre le varron, il se révèle donc dangereux à utiliser, parce qu'il abaisse la cholinestérase globulaire de 55 %, ce qui risque de faire apparaître des symptômes d'intoxication.

Le comportement anticholinestérasique du 13.072 R.P. (Sisvar) à la dose de 30 mg/kg est différent. 24 heures après l'application, le taux d'abaissement de l'enzyme est faible. Mais l'inhibition est plus importante après 48 heures, et plus encore après 96 heures. Ce qui signifierait que la pénétration du 13.072 R.P. est très lente.

7) Conclusion de l'expérimentation sur les bovidés.

Nos essais portant surtout sur le pouvoir anticholinestérasique du Trichlorfon ont montré qu'il varie selon la dose utilisée : faible à 20 mg/kg, il est plus important à 40 mg/kg. Néanmoins on peut remarquer des différences de sensibilité d'un animal à l'autre. Aussi il serait intéressant de pouvoir réaliser une expérimentation sur de nombreux bovins.

Il est possible que certains animaux plus sensibles que d'autres à l'action du produit présentent alors des symptômes d'intolérance. Or l'administration d'antidotes, en particulier du type Contrathion, réalisée au moment où l'on décèle les signes révélateurs d'un début d'intoxication, n'a que peu d'action sur la remontée du taux des cholinestérases. L'expérience 4 page 118 montre en effet que le Contrathion administré à ce moment tout au plus empêche un nouvel abaissement des cholinestérases sans obtenir leur relèvement. Aussi il conviendrait, si l'on voulait opérer à dose élevée, d'administrer l'antidote en même temps que l'organophosphoré. Ce qui nécessite une manipulation supplémentaire.

Or la dose faible de 20 mg/kg se révèle être peu anticholinestérasique et en même temps très active contre le varron. Dans ce cas, l'administration d'antidotes semble être inutile.

Le Rogor ou Diméthoate se révèle beaucoup plus anticholinestérasique que le Trichlorfon. Ce fait a été établi chez le chien, car chez les bovidés, nous n'avons pas réalisé d'essai du pouvoir anticholinestérasique du Rogor appliqué selon la méthode "Pour-On" à dose thérapeutique.

L'expérience réalisée avec la préparation injectable à la dose de 15 mg/kg montre un grand abaissement du taux des cholinestérases. Ce qui est dû au fait que le produit, au lieu de diffuser lentement dans l'organisme à travers le cuir, est introduit directement sous la peau. Il parvient ainsi rapidement dans la circulation sanguine, réalisant d'emblée une forte inhibition, ce qui implique l'utilisation de faibles concentrations de produit.

L'utilisation du Rogor devrait donc se faire de préférence selon la méthode "Pour-On". Malheureusement son activité antivarron est plus faible que par la voie parentérale. Cependant le nombre d'animaux sur lesquels ce produit a été essayé est trop faible pour que l'on puisse tirer une conclusion définitive.

Le 13.072 R.P., employé selon la méthode "Pour-On", à activité égale sur les larves d'Hypoderme, se révèle un peu plus anticholinestérasique que le Trichlorfon. Mais l'inhibition de l'enzyme est progressive. Il aurait été intéressant de voir si le taux de cholinestérase continuait à baisser après le 4ème jour suivant le traitement, ou si le pourcentage d'inhibition trouvé à ce moment là constitue un chiffre maximum.

DISCUSSION

Au terme de ce travail expérimental, il nous paraît opportun de procéder à un examen critique des méthodes utilisées pour le dosage des cholinestérases, ainsi que des résultats obtenus in vitro, et in vivo sur les divers animaux mis en observation.

PREMIERE PARTIE

DISCUSSION DES METHODES EMPLOYEES POUR LE DOSAGE DES CHOLINESTERASES ET DE LEURS RESULTATS.

I - Méthode manométrique

1) Remarques générales

La première application de la méthode manométrique au dosage des cholinestérases sanguines a été mise au point par AMMON (8). De nombreuses modifications ont été publiées depuis, concernant principalement la nature du tampon bicarbonate, le volume de la prise d'essai de la solution à doser, la température à laquelle s'effectue l'hydrolyse enzymatique, l'espacement des lectures et le mode d'expression des résultats. Ce qui nous a posé le problème du protocole expérimental à adopter.

L'examen des diverses publications nous a conduit à rejeter certaines techniques trop compliquées, telle celle de WITTER (110). Cet auteur proposait en effet deux tampons différents, l'un pour érythrocytes contenant Cl Na , Cl K , $\text{PO}_4\text{H}_2\text{ K}$, $\text{Cl}_2\text{ Ca}$, $\text{CO}_3\text{ HNa}$, et l'autre pour plasma renfermant $\text{Cl}_2\text{ Mg}$ à la place de $\text{Cl}_2\text{ Ca}$. Les descriptions d'autres modes opératoires se sont parfois révélées assez imprécises.

Nous avons finalement adopté, parce qu'il nous a paru le plus commode à réaliser et entouré de toutes les précautions valables, le protocole expérimental proposé par AUGUSTINSON (10). Mais nous avons été amenés à lui apporter quelques modifications.

1) le temps de passage du mélange gazeux N_2/CO_2 dans les manomètres était de 5 minutes dans la technique originale. Ne disposant pas d'un récipient à gaz de capacité suffisante, nous avons limité ce temps de passage à 2 minutes. Afin de compenser une teneur peut-être insuffisante en mélange N_2/CO_2 de l'atmosphère des manomètres, nous avons par un jeu approprié des robinets laissé subsister une légère surpression que nous avons éliminée au bout de 5 minutes d'équilibre. Ce mode opératoire nous a donné toute satisfaction.

2) AUGUSTINSON n'indique pas la quantité de solution enzymatique à utiliser pour le dosage. Il note que celle-ci doit être telle que la quantité de CO_2 dégagée en 30 minutes soit de 100 à 150 μl .

Nous avons adopté la prise d'essai de 0,05 ml qui la plupart du temps répond à la condition précédente. Parfois lorsqu'il s'agit de globules rouges ayant une forte activité cholinestérasique, le volume de CO_2 dégagé est plus élevé. Il ne nous

semble pas opportun de réduire la quantité de purée globulaire à employer par suite d'erreurs possibles au cours du prélèvement. En étudiant les courbes de cinétique d'hydrolyse enzymatique qui au moins pour 30 minutes d'expérimentation sont des droites passant par l'origine, nous avons montré qu'il nous était possible de calculer le résultat en 30 minutes à partir de lectures faites sur un temps plus court. Aussi la quantité de solution enzymatique à utiliser, que nous avons fixée plus haut, est-elle valable dans tous les cas.

3) AUGUSTINNSON laissait l'hydrolyse enzymatique se réaliser à 25°. Nous avons effectué une partie de nos déterminations à cette température. Mais il nous est apparu que ces conditions n'étaient pas physiologiques. Aussi nous avons poursuivi l'expérimentation à 37°, température que nous avons définitivement adoptée.

2) Etude manométrique de la réaction acide acétique-bicarbonate

Avant de mettre en oeuvre le dosage des cholinestérases sanguines, nous avons effectué, au manomètre de WARBURG, une étude analytique de la réaction acide acétique-bicarbonate, ce qui nous a permis de mettre en évidence :

1) l'influence de la saturation du milieu réactionnel en CO₂ et du pH finalement obtenu.

2) la nécessité d'opérer sur du sang fraîchement prélevé. En effet des essais réalisés sur du sang conservé 15 jours à 3 semaines à + 4° nous ont montré qu'il retenait fortement le CO₂, ce qui conduit à des résultats par défaut.

Cette rétention de CO₂ est beaucoup plus faible si l'on utilise du sang frais. Nous avons été amenés à la réduire encore par le traitement de la dilution de solution enzymatique dans le tampon bicarbonate (celui-ci étant déjà saturé par CO₂) par le mélange N₂/CO₂. Nous avons adopté définitivement cette méthode qui nous a donné des résultats satisfaisants.

3) Méthode manométrique sur sang desséché.

En plus du mode opératoire décrit précédemment, AUGUSTINNSON (9, 11) dans une autre publication donne une méthode manométrique de dosage des cholinestérases sur du sang déposé après prélèvement sur papier filtre et desséché. Nous avons pensé que ce protocole expérimental pouvait avoir un intérêt pour la détermination des cholinestérases chez les ouvriers agricoles et plus particulièrement chez les personnes appelées à manipuler les organophosphorés utilisés dans la lutte contre le varron. En effet l'échantillon à analyser étant déposé sur papier filtre est plus facile à transporter au laboratoire.

Aussi nous avons effectué la comparaison de cette technique sur sang sec avec celle sur sang liquide. Il nous est apparu (pages 62 à 64), les résultats étant toujours abaissés, que le papier filtre retient une partie de l'enzyme. D'autre part il n'est pas possible de calculer le taux des cholinestérases globulaires en partant d'un dosage sur sang total, même en connaissant l'hématocrite.

Cependant nous devons faire la remarque qu'AUGUSTINNSON employait pour réaliser la détermination des cholinestérases sur sang sec les substrats spécifiques : acétyl β - méthylcholine pour les globules rouges, butyrylcholine pour le plasma. Il ne nous a pas été possible de les employer dans notre expérimentation. Aussi nous devons faire une réserve sur la conclusion précédente.

Par contre la rétention d'une partie des cholinestérases, surtout globulaires, sur le papier filtre, peut nous faire mettre en doute la précision de la méthode. Il serait nécessaire que la tache de sang ait toujours le même diamètre, ce qui est très difficile à réaliser dans la pratique.

Le protocole expérimental d'AUGUSTINNSON indiquait que le papier était abandonné une nuit avant la réalisation du dosage. Pensant que ce séjour trop long à l'air libre pouvait être une cause partielle d'inactivation de la cholinestérase globu-

laire, nous avons réalisé le dosage manométrique 3 heures après la confection de la tache de globules rouges. En même temps, nous avons assuré un meilleur étalement en réduisant la prise d'essai à 0,03 ml. Un premier essai avait donné des résultats satisfaisants, mais qui n'ont pas été confirmés par la suite. Il est très probable que la simple dessiccation à l'air suffise pour inactiver une partie de l'enzyme.

Pensant d'autre part pouvoir pallier la rétention de la cholinestérase sur le papier support, nous avons réalisé un essai en présence de saponine. Les déterminations ainsi effectuées ne nous ont pas donné satisfaction.

Toutes ces remarques nous conduisent à conclure que la détermination des cholinestérases sur sang sec, malgré ses avantages apparents, n'est pas une technique à recommander.

4) Cinétique de l'hydrolyse enzymatique

A la suite de ces déterminations des cholinestérases globulaires par la méthode manométrique d'AUGUSTINSON, nous avons été conduits à tracer des courbes de cinétique d'hydrolyse enzymatique. Nous avons remarqué que les points obtenus sont généralement alignés sur une droite, aux minimas erreurs d'expérience près. Une petite cause de celles-ci repose sur le fait que les lectures des manomètres étant faites en série, l'intervalle de temps n'est peut être pas toujours exactement de 10 minutes.

Néanmoins les écarts observés sont faibles. Aussi on peut affirmer que l'hydrolyse enzymatique en fonction du temps s'effectue selon une droite pendant la durée de l'expérience, limitée à 30 minutes.

Nous n'avons pas effectué d'étude comparative entre les diverses modifications proposées par de nombreux auteurs à la technique manométrique d'AMTON, en dehors de celle d'AUGUSTINSON. Notre but était en effet la recherche d'une méthode de référence dont les résultats devaient être comparés à ceux de la colorimétrie d'après la réaction de HESTRIN (53).

II - Méthodes colorimétriques

L'apparente facilité et la rapidité plus grande des méthodes colorimétriques de dosage des cholinestérases dérivées de la méthode de HESTRIN nous a conduit à largement expérimenter leurs diverses adaptations et à les comparer avec la méthode manométrique précédemment standardisée.

Nous n'avons pas étudié tous les protocoles expérimentaux proposés par les auteurs. Nous avons choisi la technique de W.E. ROBBINS (90) parce qu'elle était spécialement adaptée au dosage des cholinestérases dans le sang des bovidés, et que pour ce fait elle allait nous servir dans l'expérimentation des produits employés dans la lutte contre le varron. Les autres modes opératoires utilisés ont été publiés au cours de ces dernières années par des auteurs français : H. GUYOT (51), D. VINCENT et G. SEGONZAC (106, 107), R. TRUHAUT (102), S. CHARONNAT (22). Il existe bien d'autres méthodes, notamment celle de K.B. AUGUSTINSON (10) que nous n'avons pas essayée parce qu'elle nécessite un colorimètre spécial.

La solution enzymatique utilisée pour le dosage est le sérum (D. VINCENT et G. SEGONZAC sérique), les globules rouges (H. GUYOT) ou le sang total (R. TRUHAUT, S. CHARONNAT, W.E. ROBBINS, D. VINCENT et G. SEGONZAC sang total). Nous avons réalisé toutes les techniques précédentes sur globules rouges et plasma séparés, afin de pouvoir procéder à une meilleure étude comparative.

Avant d'effectuer l'examen critique de chaque méthode, nous allons rappeler les causes d'erreur qui peuvent influencer les résultats colorimétriques.

1) Les écarts entre ceux-ci, surtout en ce qui concerne les déterminations de cholinestérases dans les globules rouges, ne doivent être considérés comme significatifs que si les solutions colorées terminales soumises à la détermination spectro-

photométrique sont d'une absolue limpidité.

2) On notera la multiplicité des mesures de réactifs. Or chacune d'elle peut être entachée d'une erreur qui pourra avoir une influence sur le résultat final.

3) Nous rappellerons que pour réaliser une détermination manométrique, seule la solution enzymatique doit être mesurée avec une très grande précision. La proportion de bicarbonate et de substrat ne joue guère, car ils sont tous les deux employés en excès. On doit seulement veiller à ce que la quantité de liquide contenue dans les fioles soit rigoureusement constante, ce qui est facile si l'on utilise toujours les mêmes pipettes.

Par contre en colorimétrie, la solution de substrat doit aussi être mesurée avec précision. Sa préparation doit être effectuée avec le plus grand soin.

4) Il est nécessaire, surtout si l'on réalise des déterminations en série, de bien mélanger la solution enzymatique et le substrat avant hydrolyse. Sinon les résultats obtenus seront déficitaires.

Un inconvénient de la colorimétrie réside dans le fait qu'on laisse réaliser l'hydrolyse enzymatique par simple repos des tubes au bain-marie. Or il est à peu près certain que l'agitation favorise la réaction.

5) Le temps de séjour des tubes au bain-marie doit être mesuré avec précision. A la fin de celui-ci, la réaction enzymatique est stoppée à l'aide d'un réactif approprié. Lorsque l'on effectue des dosages en série, il faudrait théoriquement que la durée d'addition du substrat soit rigoureusement égale à celle de la solution destinée à bloquer l'hydrolyse enzymatique. Or dans la pratique, cette condition est difficile à réaliser. Il peut y avoir un décalage, ce qui constitue certainement une cause d'erreur. Celle-ci est d'autant plus importante que le temps d'hydrolyse est plus court. C'est pourquoi nous avons adopté 30 minutes comme durée de la réaction enzymatique.

6) Pour que la solution colorée finale soit d'une limpidité parfaite, il importe que les protéines sanguines soient éliminées à l'aide d'un réactif qui les précipite. Celui-ci varie selon les auteurs et nous verrons lors de la critique de chaque méthode que son influence est grande sur les résultats obtenus.

7) D'autres conditions peuvent encore intervenir : fraîcheur des solutions d'hydroxylamine, temps de passage au spectrophotomètre, propreté des cuves en verre.

Toutes ces causes d'erreur expliquent pourquoi une détermination de cholinestérases par colorimétrie est une opération toujours délicate et que, même en prenant toutes les précautions nécessaires, sa précision est inférieure à celle de la méthode manométrique.

Il importe maintenant de faire un certain nombre de remarques sur chacune des méthodes employées.

1) Méthode de H. GUYOT

Cet auteur commence par effectuer une dilution de 0,05 ml de globules rouges dans 0,15 ml d'eau distillée. Nous avons pu remarquer que cette opération était délicate à réaliser, surtout si les déterminations sont faites en série.

Le blocage de l'hydrolyse enzymatique s'effectue par addition de Cl H N. Puis H. GUYOT réalise la réaction colorée selon la technique de HESTRIN classique. Ensuite il précipite les protéines par l'acide trichloracétique. Cette pratique a pour conséquence, et l'auteur le reconnaît lui-même, d'affaiblir la coloration de la solution d'hydroxamate ferrique. Ce qui pourrait expliquer le fait que les résultats obtenus sont dans la plupart des cas nettement plus faibles que ceux de la méthode manométrique.

2) Méthode de D. VINCENT et G. SEGONZAC sur sérum

La réaction enzymatique n'appelle pas de commentaires particuliers. Par contre nous devons remarquer que si le blocage de l'hydrolyse du substrat est effectué par addition de ClH N, les auteurs ne prévoient aucun dispositif d'élimination des protéines. Ce mode opératoire est donc inapplicable pour le sang total et les globules rouges. Mais même le plasma contient des protéines et nous avons remarqué que les solutions finales n'étaient pas d'une parfaite limpidité. Les résultats obtenus étaient d'ailleurs inconstants.

3) Méthode de R. TRUHAUT

Cet auteur laisse la réaction enzymatique s'effectuer à 25° pendant 10 minutes. D'où un double inconvénient :

a) le temps d'hydrolyse est trop court, ce qui est gênant pour les déterminations en série.

b) la température de 25° n'est pas physiologique. La vitesse de la réaction enzymatique est alors diminuée. Aussi les écarts de la coloration entre les tubes de la réaction seront faibles, d'où cause d'erreur plus grande.

Mais la critique la plus grave que l'on puisse faire à ce mode opératoire concerne l'usage comme déprotéinisant de l'acide perchlorique. Ce réactif est employé juste avant la transformation de l'hydroxamate alcalin en hydroxamate ferrique, et la filtration n'intervient qu'après. Nous avons remarqué que le filtrat obtenu n'était pas toujours absolument limpide, malgré un essai de clarification ultérieur par centrifugation. Les résultats obtenus étaient tantôt plus élevés, tantôt plus faibles que ceux de la méthode manométrique, ce qui est certainement dû au mauvais pouvoir déprotéinisant de l'acide perchlorique.

4) Méthode de W.E. ROBBINS

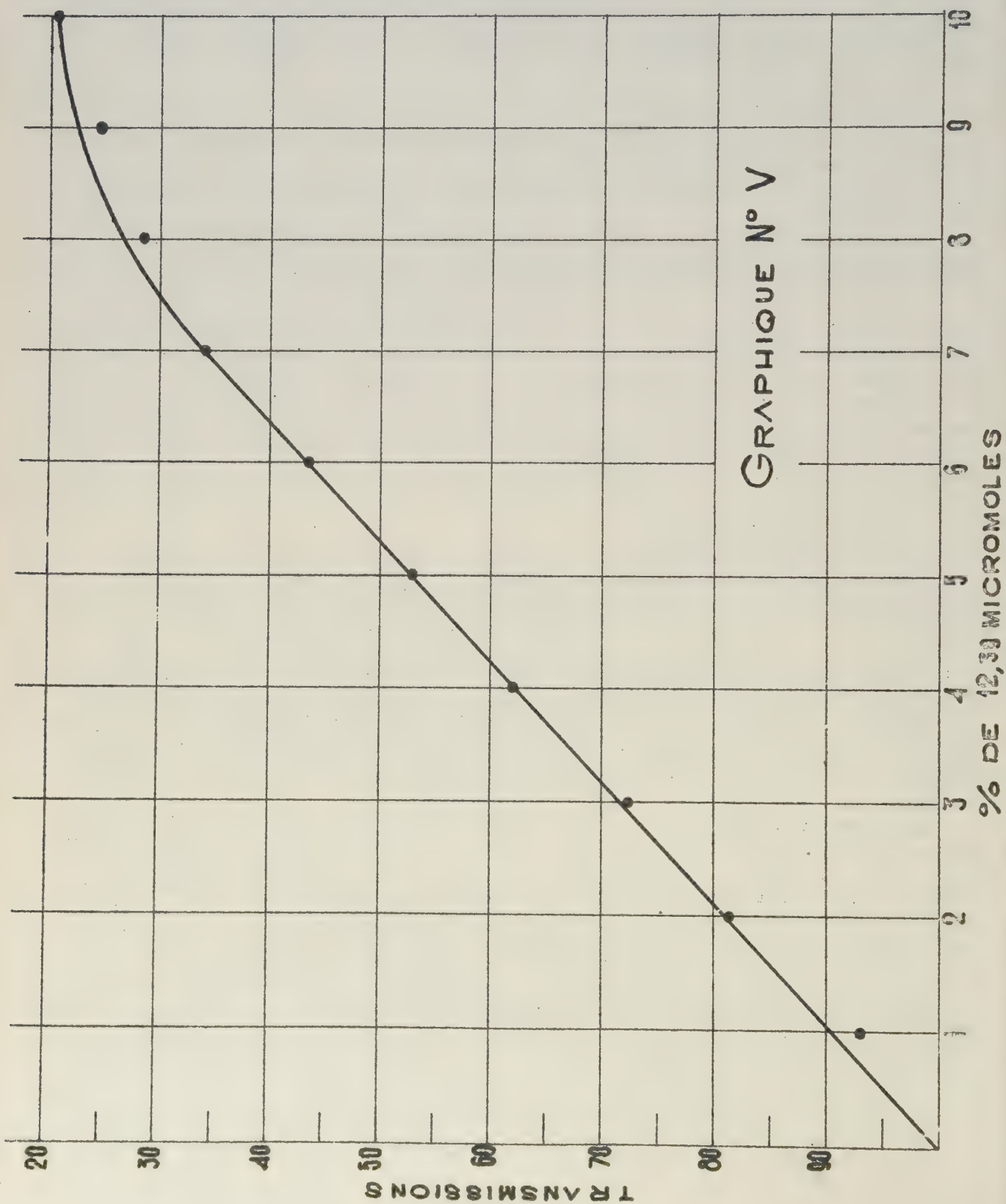
Cette méthode est assez simple à réaliser. La solution de ClH 4N à la dose de 2 ml est un bon agent précipitant des protéines et les filtrats obtenus sont toujours absolument limpides. Nous pourrions cependant reprocher à cette technique d'utiliser des quantités de réactifs assez élevées, notamment en hydroxylamine.

Afin de pouvoir réaliser des dosages en série, nous avons modifié le temps d'hydrolyse enzymatique initial de 10 minutes et l'avons porté à 30 minutes. Mais nous avons remarqué que si l'activité cholinestérasique de l'échantillon est importante, la quantité de substrat prévue initialement par l'auteur se révèle insuffisante. Etant donné que tous nos dosages ont été préalablement réalisés selon la technique manométrique, nous avons pu facilement remédier à cet inconvénient en utilisant un substrat plus concentré si besoin est.

Seulement dans la pratique il est parfois nécessaire de pouvoir réaliser la méthode de W.E. ROBBINS seule. Aussi on utilise d'emblée un substrat plus concentré. Si la coloration du tube réaction est plus foncée que celle du substrat témoin à 4,13 μ moles/ml, on réalise une dilution que l'on mesure au spectrophotomètre. Il est alors nécessaire de préparer plusieurs dilutions de chlorure d'acétylcholine à des concentrations différentes. Toutes ces opérations doivent être réalisées avec soin pour ne pas introduire de cause d'erreur supplémentaire.

Cependant nous avons essayé en réalisant une courbe d'étalonnage avec diverses dilutions d'une solution de chlorure d'acétylcholine à 12,39 μ moles/ml, d'établir la possibilité d'effectuer le dosage avec une seule concentration de substrat et sans dilution. (graphique V)

COURBE D'ETALONNAGE DE LA METHODE DE ROBBINS
REALISEE AVEC DES DILUTIONS D'UNE SOLUTION DE CHLORURE
D'ACETYLCHOLINE A 12,39 MICROMOLES/ml.



Nous avons constaté qu'au delà de 9 μ moles/ml, la loi de Beer-Lambert n'est plus suivie. Aussi la méthode préconisée plus haut est-elle inapplicable, car elle donnerait des résultats erronés si les activités cholinestérasiques sont faibles, laissant alors une quantité importante de substrat inaltéré.

Il apparaît donc que dans ce cas une dilution de la solution colorée finale est nécessaire avant lecture au spectrophotomètre.

Le fait d'utiliser la solution de chlorure d'acétylcholine à 12,39 μ moles/ml n'exerce pas de pouvoir inhibiteur vis à vis des cholinestérases globulaires. En effet nous avons constaté que la concentration finale en substrat était encore plus élevée dans la technique manométrique.

5) Méthode de S. CHARONNAT

Cette méthode dont les résultats sont assez comparables à ceux de la technique manométrique n'appelle pas de commentaires particuliers. La déprotéinisation s'effectue par l'acide trichloracétique en même temps que le blocage de la réaction enzymatique et le précipité obtenu est tout de suite éliminé par centrifugation. L'avantage de cette manière d'opérer est de pouvoir réaliser la réaction colorée sur une solution déjà limpide. Mais pour les dosages en série, la centrifugation présente l'inconvénient d'allonger le temps de manipulation, et ceci d'autant plus que la capacité de la centrifugeuse que nous avons utilisée était limitée à 4 tubes. Un essai réalisé en remplaçant la centrifugation par une simple filtration nous a donné des résultats trop inconstants pour que cette technique ainsi modifiée soit applicable à nos déterminations en série.

6) Méthode de D. VINCENT et G. SEGONZAC avec ou sans Diparcol.

Nous devons remarquer que dans cette technique la déprotéinisation s'effectue de la même manière que dans la méthode de S. CHARONNAT et qu'elle appelle donc les mêmes commentaires.

Nous avons été amenés à modifier le mode opératoire initialement prévu par D. VINCENT et G. SEGONZAC, sur plusieurs points.

a) pour vérifier l'action du Diparcol sur les cholinestérases globulaires et plasmatiques, nous avons réalisé la méthode sur globules rouges et plasma séparés.

b) une série de déterminations sur sang total de boeuf avec la prise d'essai de 0,02 ml proposée par les auteurs nous a donné des résultats généralement défectueux. Ce fait peut provenir soit d'erreurs lors du pipetage d'une quantité aussi faible, soit des différences de coloration finale trop peu marquées entre les différents tubes de la réaction. Aussi nous avons été amenés à utiliser une prise d'essai de solution enzymatique de 0,05 ml, qui nous a donné de bien meilleurs résultats.

c) la technique originale contraignait l'utilisateur à réaliser un témoin substrat et un témoin réactif par échantillon à analyser. Nous avons remarqué que les témoins substrat pour globules rouges, pour plasma et pour sang total présentaient entre eux de très légères différences. Mais pour adapter la méthode de D. VINCENT et G. SEGONZAC aux déterminations en série, nous avons été amenés à ne conserver qu'un seul témoin, selon les techniques colorimétriques classiques, de manière à gagner du temps. Les faibles différences entre les témoins, dont nous avons parlé plus haut, nous autorisent cette réduction sans nuire à la précision de la méthode.

D'après les résultats obtenus, nous avons conclu que la détermination différentielle des cholinestérases globulaires et plasmatiques à partir d'un dosage sur sang total nous conduisait à des résultats souvent aberrants. Ce qui est dû, d'une part au fait que certains plasmas contiennent un peu de cholinestérase vraie qui subsiste même après action du Diparcol, d'autre part au fait que ce produit, ainsi que nous l'avons vu, inhibe aussi partiellement la cholinestérase globulaire. N'ayant opéré

que sur sang total, les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence ces phénomènes.

Nous rappellerons ici que le Diparcol est utilisé comme neuroplégique dans le traitement de certains cas d'intoxication par les composés organophosphorés, en association avec l'atropine et le Contrathion. Or le Diparcol est lui-même un inhibiteur des cholinestérases, surtout plasmatiques. Cette constatation devrait inciter à n'utiliser le Diparcol que dans des cas bien particuliers, et en surveillant à intervalles réguliers le taux de cholinestérases globulaires et plasmatiques. Les variations de ces dernières permettent de déceler un éventuel surdosage en Diparcol.

7) Essais sur sang sec par colorimétrie

Ayant effectué des déterminations de cholinestérases sur sang sec selon la technique manométrique d'AUGUSTINSON, et bien que celles-ci ne nous aient pas donné de résultats satisfaisants, nous avons voulu essayer ce mode de prélèvement en colorimétrie.

Après une première série d'essais, nous obtenons des résultats nettement inférieurs à ceux donnés par le sang liquide. Pensant que par suite de la non agitation des tubes pendant l'hydrolyse, une quantité importante de cholinestérases était retenue par le papier support, nous avons réalisé une nouvelle série d'essais. Après 10 à 15 minutes de contact avec la saponine, nous avons retiré les morceaux de papier filtre. Nous les avons ensuite exprimés et rincés avec 1 ml de solution de saponine. Sur les deux liquides réunis, nous avons effectué le dosage de W.E. ROBBINS classique. Les chiffres obtenus ne sont pas meilleurs que ceux du premier essai. L'expression du papier filtre, délicate à réaliser et le fait de mélanger la solution enzymatique et les eaux de lavage du papier sont des causes de pertes.

Nous n'avons trouvé dans la littérature aucune technique sur sang sec par colorimétrie. Il est possible que certains auteurs l'aient réalisée, et qu'ils ne l'aient pas publiée parce que les résultats obtenus n'étaient pas satisfaisants.

III - Temps de manipulation des techniques adoptées

Afin de sélectionner le mode opératoire le plus rapide, nous avons déterminé la durée des diverses phases de manipulation de la technique manométrique de K.B. AUGUSTINSON (3 h.30) et colorimétriques selon W.E. ROBBINS (1 h.20) et selon D. VINCENT et G. SEGONZAC pour sang total (2 h.). Ces notions pourraient permettre de standardiser ces diverses méthodes.

Nous avons indiqué dans le courant de l'exposé que la durée des manipulations dépendait du nombre d'échantillons à analyser, du matériel utilisé et de l'habileté de l'expérimentateur. C'est vrai surtout pour la technique manométrique où le fait d'avoir une ou deux déterminations en plus oblige à toute une manipulation additionnelle. En colorimétrie, un ou deux dosages supplémentaires allongent peu le temps total de l'opération.

IV - Autres méthodes de dosage des cholinestérases

Nos conclusions ne peuvent être que très discrètes pour les méthodes potentiométriques que nous n'avons pas personnellement utilisées, bien qu'elles figurent dans nos tableaux expérimentaux à la suite de leur application faite au laboratoire de Monsieur le Professeur MAGAT à l'Ecole Vétérinaire sur les sangs des bovidés qui nous ont servi pour nos essais.

Il apparaît cependant que ces déterminations ne peuvent pratiquement se faire qu'échantillon par échantillon. D'autre part, vu le mode différent d'expression des résultats, on ne peut les comparer directement à ceux donnés par les méthodes manométriques ou colorimétriques.

Il ne nous est pas possible de juger personnellement de la valeur des autres techniques de dosage des cholinestérases. Cependant nous devons signaler que les

sangs humains utilisés ont été également testés par Monsieur le Professeur CHAMBON selon la méthode titrimétrique de STEDMAN et WHITE (98). Les résultats trouvés étaient comparables à ceux des méthodes manométriques et colorimétriques.

V - Remarques générales concernant le dosage des cholinestérases

Nous avons indiqué qu'il était préférable de séparer globules rouges et plasma avant de faire le dosage des cholinestérases. Les déterminations de cholinestérase globulaire ou plasmatique provenant d'un calcul où intervient le taux d'enzyme trouvé dans le sang total, et l'hématocrite, ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants.

La centrifugation destinée à séparer les globules rouges du plasma était réalisée dans des tubes gradués de 1 cm environ de diamètre. L'hématocrite était lu sur cette graduation.

Seulement le temps et la vitesse de centrifugation peuvent avoir une influence sur le tassement des globules rouges entre lesquels il reste une quantité plus ou moins grande de plasma.

D'autre part vu l'ouverture trop large du tube, des erreurs de lecture peuvent résulter de la mauvaise appréciation du ménisque et de la couche de globules blancs surnageants.

Aussi il est vraisemblable que les résultats défectueux que nous avons trouvés dans les calculs à partir de l'hématocrite soient dus à une mauvaise détermination de celui-ci. Il aurait fallu utiliser des tubes spéciaux pour hématocrite à ouverture étroite.

Cette réserve étant faite, il y a tout de même avantage à opérer sur globules rouges et plasma séparés. En effet les deux cholinestérases n'ont pas du tout la même signification. Celle des globules rouges est identique à l'enzyme du système nerveux dont le rôle physiologique est capital. Par contre la cholinestérase plasmatique est un enzyme non spécifique qui est capable d'hydrolyser un grand nombre d'esters, et dont la diminution n'aura pas les conséquences graves de l'abaissement de l'enzyme globulaire.

Cependant pour diagnostiquer la nature et la sévérité d'une intoxication, le dosage de la cholinestérase plasmatique doit être réalisé parallèlement à la détermination de la cholinestérase globulaire. En effet d'après MARCHAND (76), de faibles valeurs pour le seul plasma indiquent un empoisonnement aigu, mais léger. Un taux d'enzyme globulaire abaissé et d'enzyme plasmatique normal montre une intoxication aiguë plus ancienne, ou par des doses répétées. Enfin un abaissement général des cholinestérases permet le diagnostic d'une intoxication aiguë grave. Ces nuances ne pourraient pas être détectées par un dosage qui serait effectué seulement sur sang total.

Au cours de notre étude, nous avons voulu rechercher une méthode de dosage des cholinestérases qui soit à la fois précise et rapide en vue du problème de l'urgence de cette détermination dans un but de diagnostic et de mise en oeuvre d'une thérapeutique.

Dans le cas d'ouvriers ou d'agriculteurs manipulant des organophosphorés, on connaît le toxique et de ce fait on peut en cas d'intoxication mettre tout de suite en oeuvre la thérapeutique appropriée sans avoir recours à une détermination des cholinestérases. Celle-ci sera par contre utile dans la suite pour suivre l'état du malade. Il n'est alors plus question d'urgence et l'on pourra mettre en oeuvre deux techniques différentes.

Par contre le laboratoire pourrait être amené à donner une réponse rapide, par exemple dans le cas d'un enfant qui absorberait par erreur un produit organophosphoré ou tout autre inhibiteur des cholinestérases (ésérine, collyre à l'ésérine, génésérine) et présenterait des symptômes d'intoxication. Ceux-ci peuvent

d'ailleurs parfois orienter le diagnostic. Le dosage des cholinestérases, même par la méthode de W.E. ROBBINS qui est la plus rapide, demande tout de même 2 heures pour sa réalisation et il est parfois nécessaire de mettre en oeuvre un traitement auparavant.

Dans ce cas, les tests dits de "campagne" précédemment signalés, malgré leur faible précision, peuvent rendre des services en urgence, à condition de réaliser parallèlement un dosage par une technique précise pour se rendre compte de l'importance de l'intoxication.

Le contrôle du taux des cholinestérases chez les chimistes, ouvriers et agriculteurs qui manipulent des organophosphorés pose un autre problème : celui des dosages en série. Dans ce cas, les méthodes colorimétriques présentent un avantage certain et si l'on dispose d'un bain-marie de capacité suffisante et de porte-tubes appropriés, on peut réaliser un grand nombre de déterminations à la fois. Par contre l'appareil de Warburg le plus habituel ne permet le dosage simultané des cholinestérases que dans 12 échantillons différents, soit 6 sangs si l'on opère sur globules rouges et plasmas séparés. La méthode manométrique est donc d'un emploi plus limité pour des déterminations en série.

DEUXIEME PARTIE

DISCUSSION CONCERNANT LE TAUX DES CHOLINESTERASES CHEZ DIVERSES ESPECES ANIMALES.

Notre étude de l'action des organophosphorés chez les bovidés nous a conduit à examiner la répartition des cholinestérases chez quelques autres animaux domestiques. Ceux-ci pourraient être éventuellement intoxiqués par des produits anticholinestérasiques si toutes les précautions nécessaires à leur manipulation ne sont pas prises. Aussi il est intéressant de connaître le taux normal des cholinestérases, aussi bien globulaires que plasmatiques chez ces animaux.

Notre travail s'est limité à fournir cette indication et n'est pas une étude systématique du taux des cholinestérases, qui nous aurait nécessité une expérimentation sur un nombre d'animaux beaucoup plus grand.

Par la confrontation des résultats obtenus chez le chien et les bovidés, nous avons pensé qu'il pourrait peut-être exister un rapport entre le taux de cholinestérase plasmatique et la nature de l'alimentation de l'animal. Mais les expériences ultérieures ne nous ont pas permis de confirmer cette hypothèse. En effet, le cheval, bien qu'il se nourrisse d'herbe a un taux de cholinestérase plasmatique plus élevé que le chien.

Certaines techniques de dosage n'ont pas été réalisées avec tous les animaux étudiés. En effet nous avons essayé diverses méthodes colorimétriques sur le sang de certaines espèces animales. Par la suite, nous n'avons mis en oeuvre que les techniques les plus commodes et les plus rapides.

Le tableau récapitulatif qui a été donné page 101 montre que la méthode colorimétrique de W.E. ROBBINS qui donne des résultats excellents chez l'homme et chez le boeuf, se révèle beaucoup moins satisfaisante avec d'autres espèces animales.

Dans les plasmas de chat et de cheval, nous avons pu mettre en évidence une substance qui réagit avec l'hydroxylamine. Mais ce fait n'explique pas entièrement la différence entre la méthode colorimétrique de W.E. ROBBINS et la méthode manométrique pour certaines espèces animales.

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION DE L'EXPERIMENTATION REALISEE AVEC LES COMPOSES ORGANOPHOSPHORES UTILISES DANS LA LUTTE CONTRE LE VARRON.

Cette expérimentation comporte deux grands chapitres :

- essais chez le chien
- essais chez les bovidés

Nous ferons leur examen critique séparément.

I - Essais chez le chien

L'application percutanée des produits organophosphorés antivarron chez le chien a été réalisée à titre comparatif et expérimental au laboratoire, au rythme de 3 applications à 3 jours d'intervalle.

Nous avons observé les abaisssements des cholinestérases plasmatiques et globulaires suivants :

	<u>Voie percutanée</u>			
	ROGOR 15 mg/Kg		TRICHLORFON 20 mg/Kg	
	globules rouges	Plasma	Globules rouges	Plasma
1ère application	28 %	8,5 %	4,5 %	13,5 %
2ème "	39 %	21 %	26,5 %	22,5 %
3ème "	23 %	+ 6,5 %	11 %	22,5 %
4ème "			12,5 %	6,5 %

Ces pourcentages d'abaisssement sont généralement assez faibles. Aussi allons nous essayer d'en déterminer les causes possibles.

Au cours de l'application de l'émulsion huileuse contenant le produit actif (environ 20 ml), il n'est pas possible d'éviter complètement les pertes. Un peu de liquide reste après les parois du flacon et dans le coton, même après expression à la pince.

D'autre part la pénétration du composé organophosphoré à travers la peau du chien n'est certainement pas totale.

Aussi la quantité de produit à essayer réellement absorbée par le chien par la voie percutanée est inférieure à la dose théoriquement appliquée.

Il aurait été convenable de réaliser toutes les déterminations de cholinestérases à 37°, ce qui aurait permis une meilleure comparaison des résultats obtenus. Bien que quelques essais aient été effectués à la fois à 25° et à 37°, il n'a pas été possible d'établir un coefficient de proportionalité.

Nous observons que le taux de cholinestérase globulaire se relève après la 3° application d'organophosphoré. On pourrait incriminer la moins bonne pénétration du

produit à travers la peau, ou peut être sa destruction par des systèmes enzymatiques. Nous ne pouvons que formuler des hypothèses.

Le taux des cholinestérases du chien, aussi bien globulaires que plasmatiques, est déjà faible au départ, ce qui est gênant pour apprécier un éventuel abaissement sous l'action des composés organophosphorés.

II - Essais chez les bovidés

1) avec le Trichlorfon

Trois séries d'expériences ont été réalisées. Le produit a été appliqué par voie percutanée ("Pour-On") aux doses suivantes :

- a) 20 mg/Kg
- b) 40 mg/Kg
- c) 20 mg/Kg répété 3 fois à 3 jours d'intervalle

Nous rappellerons les abaisséments moyens obtenus :

Expérience a :	Expérience b	Expérience c
1 heure après : 5,5 %	3 heures après : 11,5 %	1 ^o application : 17,5 %
7 " 12 %	24 " 41,5 %	2 ^o " 32,5 %
24 " 17,5 %		3 ^o " 38 %
48 " 18,5 %		
72 " 14,5 %		

Les traitements réalisés en pratique dans les élevages de bovins ne comportent qu'une seule application de Trichlorfon à la dose de 20 mg/Kg. Il était évidemment intéressant de connaître son comportement anticholinestérasique.

Les essais réalisés à doses plus élevées ou en applications répétées l'ont été à titre purement expérimental, afin de se faire une meilleure idée du pouvoir anticholinestérasique du Trichlorfon.

L'application du produit est réalisée par simple dilution d'une solution concentrée livrée toute prête par le fabricant. Aussi les risques de pertes sont-ils minimes. Au cours de l'application, nous avons pu remarquer que le liquide était intégralement retenu par le poil des génisses traitées. Ce qui ne veut pas dire que tout le Trichlorfon appliqué a traversé le cuir de l'animal.

Chaque expérimentation ayant porté sur 2 génisses, nous remarquons que les pourcentages de baisse sont assez semblables d'un animal à l'autre.

2) avec le Parathion

Bien que le Parathion soit depuis longtemps abandonné dans la lutte contre le varron, il nous permet cependant de comparer son pouvoir anticholinestérasique très élevé avec celui des organophosphorés utilisés actuellement pour le traitement de l'hypodermose bovine.

Pour éviter l'apparition de symptômes d'intoxication chez l'animal traité, nous avons utilisé 0,30 mg/Kg de Parathion, dose faible comparée à celles du Rogor et du Trichlorfon (20 mg/Kg). Nous obtenons cependant une inhibition des cholinestérases de 50 %.

Nous reviendrons plus loin sur la notion de toxicité comparée des divers produits que nous avons utilisés.

3) avec le Rogor (Diméthoate)

Il ne nous a pas été possible, faute de temps nécessaire, de déterminer le pouvoir anticholinestérasique du Rogor utilisé selon la méthode "Pour-On" chez les bovidés. Aussi reconnaissons nous que notre expérimentation au sujet de ce produit est incomplète.

Nous avons par contre réalisé un essai avec le Rogor en injection sous-cutanée, à la dose de 15 mg/Kg. 20 ml de solution ont été injectés à l'encolure de la génisse. Cette voie d'introduction est effectivement utilisée avec succès dans le traitement contre le varron. Nous pouvons remarquer que cette manière de procéder est plus délicate que la méthode "Pour-On" et nécessite un personnel plus spécialisé.

La dose administrée se révèle posséder un pouvoir anticholinestérasique important, de l'ordre de 55 %. D'où un danger d'intoxication possible pour l'animal. Aussi il serait nécessaire si l'on voulait employer le Rogor par cette voie de diminuer la dose. Mais on peut se demander si l'efficacité du produit contre le varron serait maintenue.

4) avec le 13.072 R.P.

Le 13.072 R.P. a été expérimenté à la dose de 30 mg/Kg selon la méthode "Pour-On". Il a été effectivement employé à cette dose dans le traitement contre le varron par Monsieur le Professeur MAGAT (74) et se révèle très actif. Il était donc intéressant d'étudier son pouvoir anticholinestérasique.

Pourcentage de baisse

13.072 R.P. 30 mg/Kg voie percutanée

24 heures après :	7%
48 " " :	22%
96 " " :	33%

Celui-ci est plus important que celui du Trichlorfon. Mais il est aussi plus progressif. D'autre part la dose de 13.072 R.P. utilisée est plus élevée et il aurait été intéressant de réaliser une expérience à la dose de 20 mg/Kg afin de pouvoir comparer le comportement des 2 produits.

Rappelons que le 13.072 R.P. qui n'a été commercialisé que tout récemment n'a pas encore été utilisé sur une grande échelle dans la lutte contre le varron.

III - Action des antidotes

Les abaissements parfois considérables de l'activité cholinestérasique sous l'influence des organophosphorés pouvant entraîner des accidents, il était intéressant d'examiner le comportement des antidotes classiques chez les animaux en expérience.

Deux sortes d'antidotes sont employés en pratique :

- l'atropine, parasympatolytique qui s'oppose aux effets de l'acétylcholine.
- les réactivateurs des cholinestérases, notamment le Contrathion.

Nous devons rappeler que ces derniers produits sont connus pour manifester leur activité maximum s'ils sont administrés avant ou immédiatement après l'absorption de produits organophosphorés.

Il en résulte que le protocole de notre expérience qui a consisté à administrer le Contrathion 24 heures après l'application de Trichlorfon à 40 mg/Kg, est sujet à critique. Nous allons rappeler les abaissements obtenus.

TRICHLORFON 40 mg/Kg voie percutanée

Pourcentage de baisse

24 h. après Application de l'antidote	28 % Néant	22,5 % Atropine 30 mg	19 % Contrathion 2 g	21,5 % Atropine et Contra- thion aux doses pré- cédentes.
48 h. après	35,5 %	45,5 %	20,5 %	29,5 %
72 h. "	37 %	47,5 %	19 %	29,5 %
96 h. "	38,5 %	49,5 %	22,5 %	34 %
6 jours "	56,5 %	59 %	26,5 %	40,5 %

Les auteurs qui ont étudié les réactivateurs indiquent que l'élimination de ceux-ci est très rapide. Aussi il aurait été intéressant d'étudier l'action du Contrathion sur les cholinestérases inhibées par le Trichlorfon, en répétant les injections de l'antidote pendant une période de temps déterminée.

Il ressort de cette expérience que les antidotes utilisés 24 heures après le traitement par l'organophosphoré n'ont qu'une efficacité très réduite sur l'inhibition des cholinestérases.

Notre expérience consistait également à suivre la régénération des cholinestérases après inhibition. On sait en effet qu'après un temps plus ou moins long, le niveau primitif des cholinestérases se rétablit.

Cette étude a été effectuée avec le Parathion par deux auteurs italiens : VENTUROLI et TUNIOLI (104). Ils ont administré per os le Parathion à 4 veaux, aux doses de 5, 10, 15 et 20 mg/Kg. Le traitement a été répété plusieurs jours au cours desquels ils ont déterminé l'abaissement du taux des cholinestérases. Puis ils ont suivi la régénération de l'enzyme. A 20 mg/Kg, dose pour laquelle les auteurs ont observé une inhibition de 100 %, la remontée du taux des cholinestérases n'est pas encore terminée au bout de 20 jours et un dosage réalisé à ce moment là montre un chiffre encore inférieur de 30 % à la valeur initiale.

Nos expériences avec le Trichlorfon à 40 mg/Kg par voie percutanée, ont été limitées à 6 jours d'observation. Ce délai est évidemment un peu bref. Nous devons rappeler qu'à la dose de 20 mg/Kg (page 110), nous remarquons une légère remontée du taux de l'enzyme globulaire 72 heures après le traitement.

IV - Toxicologie comparée des composés organophosphorés étudiés

Nous pouvons réaliser cette étude en considérant :

- le pourcentage maximum d'inhibition des cholinestérases observé au cours de nos expériences.
- les doses léthales DL 50 pour souris des produits essayés.
- l'activité antivarron de ces mêmes produits.

Nom du produit	Dose et voie d'administration	% d'inhibition 24 h. après traitement sauf indication contraire	DL 50 souris	Activité antivarron
Rogor (Diméthoate)	15 mg/Kg sous-cutanée	55 %	140 mg/Kg per os	99,5 % (pour 20 mg/Kg)
Parathion	0,30 mg/Kg percutanée	50 %	7 mg/Kg sous-cutanée	Inconstante
Trichlorfon	20 mg/Kg percutanée	18 %	500 mg/Kg intra-péritonéale	100 %
-d°-	-d°-	38 %		
	répétés 3 fois à 3 jours d'intervalle	après 3ème traitement		
-d°-	40 mg/Kg percutanée	41 %		
13.072 R.P.	30 mg/Kg percutanée	33 % (4 jours après traitement)	350 mg/Kg per os	98 %

Bien entendu les doses et les voies d'administration différent.

Il ressort néanmoins de cette confrontation des pouvoirs inhibiteurs des cholinestérases globulaires et des DL 50 souris de ces organophosphorés que le Parathion, si largement utilisé dans la lutte contre les parasites des arbres fruitiers est beaucoup plus toxique que les organophosphorés antivarron. De plus son activité sur les larves d'hypoderme est inconstante alors que le Rogor, Trichlorfon et 13.072 R.P. tuent ces parasites dans une proportion avoisinant 100 %.

Aussi il ne semble pas qu'il y ait un rapport entre la toxicité pour l'hôte du produit utilisé et son activité antivarron.

Cette dernière n'est pas modifiée par l'administration concomitante d'un antidote tel que le Contrathion et du composé organophosphoré. (Page 108).

V - Toxicité des produits utilisés dans la lutte contre le varron pour le personnel appelé à les manipuler.

Bien que l'utilisation des composés employés dans la lutte contre le varron ne fasse pas apparaître un risque plus grand pour les éleveurs que pour les autres utilisateurs des insecticides organophosphorés, il ressort des tableaux précédents que les produits utilisés dans la lutte contre l'hypodermose bovine ne sont cependant pas complètement inoffensifs. Leur emploi nécessitera la prise de quelques précautions.

Les préparations à base de Trichlorfon ou de composés similaires sont livrées aux éleveurs sous forme de solutions concentrées dont ils doivent assurer eux-mêmes la dilution. Au cours de cette opération, il est nécessaire d'éviter le contact du produit avec la peau et d'utiliser la solution diluée aussitôt préparée. Lors de l'épandage de celle-ci sur la région dorsolombaire du bovin, l'utilisateur doit

répandre le liquide lentement afin d'éviter d'éventuelles projections. La verrerie utilisée sera réservée uniquement au traitement antivarron. Elle ne sera pas employée par la suite pour contenir des denrées alimentaires ou des boissons.

Ces précautions sont simples et si elles sont respectées, les risques d'intoxication sont extrêmement faibles. Mais nous devons insister sur la nécessité :

- d'informer les éleveurs sur la toxicité de ces produits et leur mode d'utilisation.
- de mettre à leur disposition les antidotes, notamment le Contrathion, afin de permettre si besoin est un rapide traitement d'urgence.

Le problème du traitement du varron chez les bovidés nous incite à repenser à l'existence de myiases à *Hypoderma bovis* ou espèces voisines rencontrées beaucoup plus rarement il est vrai chez l'homme. Mais une récente publication (P. GRENET et P. CHAVELET, Société Française de Pédiatrie, 16 mars 1965) (50) signale un nouveau cas survenu chez un enfant. La phase de migration des larves s'est traduite par une symptomatologie assez bruyante.

Pourrait-on penser à appliquer un traitement par les organophosphorés évidemment les moins toxiques ? Il ne peut pour l'instant s'agir là que d'une suggestion d'avant garde et connaissant les risques, nous ne saurions prendre parti. Mais nous considérons le problème comme posé, d'autant que l'expérimentation chez les bovidés a montré que ces organophosphorés agissent encore, même à doses plus faibles, sur les phases avancées du varron, et que l'administration simultanée de l'organophosphoré et de son antidote le Contrathion ne paraît pas nuire à son efficacité antivarron.

Certes, il paraît moins aventureux de procéder à une éradication du parasite par une lutte systématique contre l'hypodermose bovine, source de la contamination humaine.

CONCLUSIONS

Le travail expérimental que nous avons entrepris se proposait dans un but à la fois toxicologique et biologique de suivre in vivo, comme témoin de l'intoxication l'inhibition des cholinestérases sanguines, provoquée par les composés organophosphorés administrés aux bovidés pour lutter contre l'hypodermose ou varron, affection qui altère à la fois la santé des animaux et la qualité de leur cuir.

D'autre part, ces produits antivarron sont susceptibles d'intoxiquer aussi les personnes appelées à les manipuler.

Nous avons été ainsi amenés à étudier parmi les différentes méthodes de dosage des cholinestérases qui ont été publiées, celles qui nous paraissent à la fois les plus sûres et les plus faciles à réaliser.

Enfin, en collaboration étroite avec Messieurs les Professeurs TAPERNOUX et MAGAT de l'Ecole Vétérinaire, et la Direction du Centre Technique du Cuir, nous avons pu bénéficier d'une large expérimentation chez les bovidés.

Nous pouvons tirer de notre travail expérimental les conclusions suivantes :

I - Le dosage des cholinestérases, dont le principe général est la mesure de l'hydrolyse en fonction du temps d'un substrat spécifique : l'acétylcholine, doit être réalisé sur des globules rouges et sur du plasma préalablement séparés et moins de 48 heures après leur prélèvement.

Une étude systématique réalisée par la méthode manométrique d'AMMON (8) modifiée par AUGUSTINSON (10) à l'appareil de WARBURG nous a montré la haute sécurité de cette technique. Nous l'avons adoptée comme étalon en effectuant l'hydrolyse enzymatique à la température de 37° pendant 30 minutes.

Le dosage sur sang sec proposé par AUGUSTINSON (9, 11) nous a donné des valeurs toujours plus faibles que celles obtenues avec du sang liquide. Aussi malgré ses avantages apparents, cette technique ne nous a pas donné satisfaction.

II - Les méthodes colorimétriques dérivées de la technique de HESTRIN (53) dosent en fait l'acétylcholine avant et après action enzymatique.

Ayant adopté les mêmes conditions de température : 37°, et un temps d'hydrolyse de 30 minutes, nous avons confronté les résultats obtenus par les diverses méthodes colorimétriques publiées et ceux de la technique manométrique étalon.

Certains modes opératoires conduisent à des résultats sensiblement plus faibles que ceux de la méthode manométrique. Les procédés et l'époque de l'élimination des matières protéiques dans le dosage colorimétrique peuvent en être rendues responsables.

La précipitation protéique par l'acide trichloracétique en fin de réaction colorée conduit à des résultats toujours trop faibles (méthode de H. GUYOT) (51).

La précipitation par l'acide perchlorique avant développement de la réaction colorée par le perchlorure de fer se signale par l'inconstance des résultats obtenus (méthode de R. TRUHAUT) (102).

Lorsque la précipitation protéique est effectuée par l'acide trichloracétique à la fin du stade d'hydrolyse enzymatique, ces inconvénients sont considérablement atténués, aussi bien dans la méthode de S. CHARONNAT (22) que celle de D. VINCENT et G. SEGONZAC (107) (technique sur sang total que nous avons adaptée aux globules rouges). Les chiffres obtenus sont très comparables à ceux de la méthode manométrique.

L'élimination chlorhydrique des protéines réalisée dans la méthode de W.E. ROBBINS (90) après transformation du substrat résiduel en hydroxamate, mais avant développement de la réaction colorée nous a donné des résultats satisfaisants.

La toute récente méthode de D. VINCENT et G. SEGONZAC (107) utilisant le Diparcol comme inhibiteur des pseudocholinestérases plasmatiques et visant un dosage différentiel sur sang total nous a donné des résultats souvent aberrants dont une partielle inactivation de la cholinestérase globulaire est en partie responsable.

Envisagée sous l'angle de la sécurité et de la rapidité, la méthode colorimétrique de W.E. ROBBINS nous semble la plus satisfaisante, suivie de près par celle de S. CHARONNAT, et celle de D. VINCENT et G. SEGONZAC adaptée au dosage des cholinestérases dans les globules rouges.

III - Nous nous sommes proposés de déterminer les valeurs normales des cholinestérases globulaires et plasmatiques chez l'homme et les principaux animaux domestiques à titre de référence pour déceler une éventuelle intoxication par des produits anticholinestérasiques.

Nous avons constaté que le taux de cholinestérases globulaires est le plus élevé chez les Primates, un peu plus faible chez les Ruminants, Equidés et Porcins. Chez les Carnivores et le lapin, les valeurs obtenues sont très faibles. Enfin chez les poulets, les globules rouges renferment une quantité insignifiante d'enzyme.

Les pseudocholinestérases plasmatiques atteignent leur taux le plus élevé chez l'homme, un peu moins chez les Equidés et les Carnivores. Il est faible chez le lapin et le poulet, très faible chez le singe et les Porcins et insignifiant chez les Ruminants.

IV - Les produits organophosphorés antivarron expérimentés sont le Rogor ou Diméthoate (thiophosphate de diméthyle et de mercaptométhyl carbamate de N méthyle), le Trichlorfon (trichloro 2,2,2 hydroxy 1 éthyl phosphonate de diméthyle) et le 13.072 R.P. ou Sisvar (N méthyl 0,0 diméthyl dithiophosphoryl 5 thio 3 diméthyl 2,2 valéramide). Ils sont employés chez les bovidés soit par voie percutanée (méthode "Pour-On") soit par voie parentérale.

Nous avons précédemment étudié leur comportement au laboratoire chez le chien et obtenu les résultats suivants :

Le Rogor à la dose de 15 mg/Kg, et le Trichlorfon à la dose de 20 mg/Kg, en émulsion huileuse ont été appliqués en badigeonnage sur le dos et les flancs du chien. La prise de sang a été réalisée 24 heures après chacun des 3 traitements, à 3 jours d'intervalle.

L'inhibition maximum des cholinestérases globulaires, qui se situe après la 2ème application de l'organophosphoré, a été de 39 % pour le Rogor et de 26 % pour le Trichlorfon. Malgré un 3º traitement par ces produits, le taux de cholinestérases globulaires se relève, sans toutefois revenir au taux initial.

Aucun des 2 chiens n'a présenté de symptômes d'intoxication.

On peut en conclure que le Rogor est un inhibiteur des cholinestérases globulaires plus puissant que le Trichlorfon.

V - Dans l'expérimentation chez les bovidés :

1) Le Trichlorfon en application percutanée fut administré à 2 génisses à la dose de 20 mg/kg. L'inhibition des cholinestérases globulaires est de 18 % au bout

de 24 heures et ne commence à diminuer qu'au delà de 48 heures.

- A la dose de 40 mg/Kg, 2 autres génisses subissent une inhibition de 41 % après 24 heures.

- Au rythme de 3 applications à 20 mg/Kg séparées par un intervalle de 3 jours, 2 génisses révèlent un abaissement progressif des cholinestérases globulaires en fonction des traitements : 17,5 %, 32,5 % et 38 % pour la dernière application.

2) Le Rogor à la dose de 15 mg/Kg administré à une génisse par voie sous-cutanée provoque après 24 heures une inhibition des cholinestérases globulaires de 55 % qui persiste les 3 jours suivants.

3) A titre comparatif, le Parathion appliqué sur une génisse à la dose de 0,30 mg/Kg par voie percutanée inhibe 50 % des cholinestérases globulaires qui ne se rétablissent que légèrement 48 heures plus tard.

4) Le 13.072 R.P. à la dose de 30 mg/Kg par voie percutanée amène chez la génisse un abaissement progressif des cholinestérases : 7% après 24 heures, 22 % après 48 heures, 33 % après 4 jours.

Aucun animal n'a extériorisé de symptômes d'intoxication.

VI - L'éventualité d'accidents toxiques au cours des traitements nous a conduit à vérifier sur l'inhibition des cholinestérases provoquée par les organophosphorés l'action des deux antidotes classiques : l'atropine, parasympatolytique et le Contrathion, (méthylsulfate de méthyl 1 hydroxyimino méthyl 2 pyridinium) régénérateur des cholinestérases. Ils sont administrés par voie sous-cutanée.

4 génisses sont traitées par le Trichlorfon à la dose de 40 mg/Kg par voie percutanée. L'une sert de témoin et après 24 heures, la 2e reçoit 30 mg d'atropine, la 3e 2g de Contrathion et la dernière les deux antidotes associés.

Les résultats chez ces animaux furent à peu près du même ordre, avec tout au plus un ralentissement provisoire de l'inhibition des cholinestérases pendant les premières 24 heures suivant l'administration du Contrathion qui n'empêche pas un abaissement ultérieur.

Ceci confirme l'obligation d'une utilisation très précoce du Contrathion.

Par ailleurs l'association Trichlorfon-Contrathion chez 4 génisses d'un lot contaminé s'est révélée aussi efficace que le traitement par le seul Trichlorfon, ainsi que le montre l'absence de varrons.

VII - Les éleveurs doivent être spécialement informés des dangers que peut présenter l'utilisation des organophosphorés antivarron, des précautions indispensables lors de leur manipulation et de la nécessité de disposer des antidotes efficaces (Contrathion).

Le dosage des cholinestérases globulaires chez l'ouvrier agricole responsable fixera le niveau d'inhibition cholinestérasique. Cette détermination renouvelée à intervalles réguliers est à recommander dans tous les cas d'intoxication, même légère. Elle permettra de mieux suivre l'évolution de la régénération des cholinestérases inhibées et de régler la conduite du traitement.

VU, le Doyen :
J.F. CIER

Le Président de la Thèse :
M. CHAMBON

VU et permis d'imprimer
LYON, le 28 Décembre 1965

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,
P. LOUIS.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADKINS T.R. Jr.-Field evaluations of Dow ET 57 as a systemic insecticide for the control of the common cattle grub in Alabama : J. Econ. Ent., 50, 474-6 (1957)
2. ALDRIDGE W.N.-Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by Diethyl p-nitrophenyl thionophosphate (E 605) and analogues : Biochem. J., 46 , 451-60 (1950)
3. ALDRIDGE W.N.-Serum esterases 2) An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera : Biochem. J., 53, 117-24 (1953)
4. ALDRIDGE W.N.-The inhibition of erythrocyte cholinesterase by triesters of phosphoric acid. 3) The nature of the inhibitory process : Biochem. J., 54, 442-8 (1953)
5. ALDRIDGE W.N. and DAVISON A.N.-The inhibition of erythrocyte cholinesterase by triesters of phosphoric acid. 2) Diethyl p-nitrophenyl thionophosphate (E 605) and analogues : Biochem. J., 52, 663-71 (1952)
6. ALDRIDGE W.N. and DAVISON A.N.-The mechanism of inhibition of cholinesterases by organophosphorus compounds : Biochem J., 55, 763-6 (1953).
7. ALLES G.A. and HAWES R.C.-Cholinesterases in the blood of man : J. Biol. Chem., 133, 375-90 (1940)
8. AMMON R.-Die fermentative Spaltung des Acetylcholins : Pflügers Arch. ges. Physiol., 233, 486-91 (1933)
9. AUGUSTINNSON K.B.-The normal variation of human blood cholinesterase activity : Acta physiol. Scand., 35, 40-52 (1955)
10. AUGUSTINNSON K.B.-Assay methods of cholinesterases : Methods of Biochemical Analysis, 5, 1-63 (1957)
11. AUGUSTINNSON K.B. and HEIMBURGER G.-The determination of cholinesterase activity in blood samples adsorbed on filter paper : Acta physiol. Scand., 30, 45-54 (1953)

12. BANISTER R.J. WHITTAKER V.P. and WIJESUNDERA S.-The chromatographic identification of propionylcholine in ox spleen : J. Physiol. (London), 115, 55 P. (1951)
13. CALLAWAY S. DAVIES D.R. and RUTLAND J.P.-Blood cholinesterase levels and range of personal variation in a healthy adult population : Brit. Med. J., 2, 812-16. (1951)
14. CELICE J., FOURNEL J., JULOU L. et DUCHESNAY G.- Etude pharmacodynamique et premiers résultats cliniques de l'emploi du sulfométhylate de l' α pyridolaldoxime (7676 R.P.), antidote des insecticides anticholinestérasiques : Thérapie, 15, 1146-56 (1960).
15. CESAIRE O.G.-Une nouvelle méthode de mesure de l'activité de la cholinestérase sérique : Ann. Biol. Clin., 10, 81-92 (1952)
16. CHAMBARD P., TAPERNOUX A., GASTELLU Ch. et MAGAT A.-Essais d'un traitement externe de l'hypodermose bovine à l'aide de préparations insecticides douées d'un pouvoir de pénétration cutané élevé : Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France, 42, 385-7 (1956)
17. CHAMBARD P., TAPERNOUX A., GASTELLU Ch. et MAGAT A.-Traitement externe et précoce de l'Hypodermose bovine : Rev. Méd.Vét., 109, 171-84 (1958)
18. CHAMBON M.-Considérations sur 3 cas d'intoxication par le Parathion. Hommage au Doyen R. FABRE. Edit. Sédès. 1956. p. 61-70
- 19.-CHAMBON M.-Aspects toxicologiques de la manipulation des insecticides organophosphorés : Journal de médecine de Bordeaux, 5, 642-8 (1957)
20. CHAMBON M.-Toxicologie des composés organophosphorés : Armes chimiques de guerre, insecticides : Bulletin de la Fédération Française des Amicales de Pharmaciens de Réserve, 52, 225-38 (1958)
21. CHANG C.H. and GADDUM J.H.- Choline esters in tissue extracts : J. Physiol. (London), 79, 255-85 (1953)
22. CHARONNAT S., CHEYMOL J., TILLEMENT J.P. et GERBAUT L.-Détermination de l'activité acétylcholinestérasique érythrocytaire humaine : Ann. Biol. Clin., 22, 909-13 (1964)
23. CHARY R., JAYOT R. et BOCQUET P.- Contribution à la toxicologie du bétail. Titration de l'activité cholinestérasique sanguine des bovins : Bul. Acad. Vét., 34, 167-74 (1961)
24. CHILDS A.F., DAVIES D.R., GREEN A.L. and RUTLAND J.P.-The reactivation by oximes and hydroxamic acids of cholinesterase inhibited by organophosphorus compounds : Brit. J. Pharmacol., 10, 462-5 (1955).
25. Council on Pharmacy and Chemistry.- Report to the Council pharmacology and toxicology of certain organic phosphorus insecticides : J. Am. Med. Assoc., 144, 104-8 (1950)

26. DALE H.H. and DUDNEY H.W. - The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse : J. Physiol. (London), 68, 97-123 (1929)
27. DALLEMAGNE M.J. - Dynamique de l'action des cholinestérases. In "Pharmacodynamie biochimique", 173-5 (1961)
28. DAVIES D.R.- Cholinesterases and the mode of action of some anticholinesterases : J. Pharm. and Pharmacol., 6, 1-26 (1954)
29. DAVIES D.R. and GREEN A.L.- The kinetics of reactivation by oximes of cholinesterase inhibited by organophosphorus compounds : Biochem. J., 63, 529-35 (1956)
30. DAVISON A.N.- The conversion of Schradane (OMPA) and Parathion into inhibitors of cholinesterase by mammalian liver : Biochem. J., 61, 203-9 (1955)
31. DAVISON A.N.- Return of cholinesterase activity in the rat after inhibition by organophosphorus compounds. I. Diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600, paraoxon) : Biochem J., 54, 583-90 (1953)
32. DE CLERMONT Ph.- Mémoire sur les esters phosphoriques : Ann. Chim. Phys., 44, 330-6 (1855)
33. DEROBERT L.- Dérivés de la série cyclique : Extrait des "Intoxications et Maladies professionnelles" pages 788-89a (Mise à jour 1963) Editions médicales Flammarion.
34. DESMAREZ J.J.- Les intoxications professionnelles, accidentelles et criminelles par les insecticides anticholinestérasiques : Bruxelles Méd., 41 (2), 1125-39 (1961)
35. DURHAM W.F. and HAYES W.J.- Organic phosphorus poisoning and its therapy : Arch. Environ. Health, 5, 21-47 (1962)
36. DUTOUR B.- Observations sur la toxicité pour le boeuf de composés organophosphorés : le Ronnel et le Diméthoate : Thèse Doct. Vét. LYON, 1962.
37. DYBING O. og HJELLE A.- Kolinesterase aktiviteten i blod hos storfe : Nord Vet. Med., 9, 41-48 (1957)
38. ELLMAN G.L., COURTNEY K.D., ANDRES V. Jr. and FEATHERSTONE R.M.- A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity : Biochem. Pharmacol., 7, 88-95 (1961)
39. EWINS A.J.- Acetylcholin, a new principle of ergot : Biochem J., 8, 44-49 (1914)
40. FABRE R. et TRUHAUT R.- Toxicologie des produits pharmaceutiques. Sedes Paris 1954.
41. FELDBERG W.- Cholinergic and non cholinergic transmission. In D. RICHTER Ed., Metabolism of the nervous system, 493-509. London Pergamon Press. 1957.

42. FLEISHER J.H. and POPE E.J.- Colorimetric method for determination of red blood cell cholinesterase activity in whole blood : Arch. Ind. Hyg. Occupational Med., 9, 323-34 (1954)

43. FOURNEL J., CELICE J. et HILLION P.- Traitement des intoxications expérimentales provoquées par le Parathion : Arch. Malad. Prof., 13, 160-8 (1952)

44. FREDERIKSSON T., FARRIOR W.L. Jr and WITTER R.F. - Studies on the percutaneous absorption of parathion and paraoxon I. Hydrolysis and metabolism within the skin : Acta Dermato - Venereol., 41, 335-43 (1961)

45. GAGE J.C.-Blood cholinesterase values in early diagnosis of excessive exposure to phosphorus insecticides : Brit. Med. J., 1, 1370-72 (1955)

46. GASTELLU Ch., TAPERNOUX A. et MAGAT A.- Traitement interne de l'hypodermose bovine à l'aide d'antiparasitaires organophosphorés : Bull. Soc. Vét. et Méd. comparée de Lyon, 3, 149-158 (1959)

47. GAUTHERON M. - Traitements percutanés de l'hypodermose bovine à l'aide de nouveaux composés organophosphorés : Thèse Doc. Vét. LYON, 1964.

48. GREGOIRE C.- L'hypodermose bovine en Belgique : Communication du Centre de Recherches techniques et scientifiques, Bruxelles, 1952.

49. GREGOIRE J., GREGOIRE J. et LIMOZIN N.- Sur l'activité des cholinestérases. I. Méthode de dosage spectrophotométrique de l'activité des cholinestérases : Bull. Soc. Chim. Biol., 37, 65-79 (1955)

50. GRENET P., BRUMPT L., CHAVELET F. et PETIT D.- Un cas de myiase à Hypoderma bovis chez l'enfant : Archives Françaises de Pédiatrie. 1965 (sous presse)

51. GUYOT H.- Mesure de l'activité acétylcholinestérasique des érythrocytes de l'homme suivant la méthode de HESTRIN adaptée par D. VINCENT : C.R. Soc. Biol. 155, 1649-51 (1961)

52. HERMANN H. et CIER J.F.- Précis de Physiologie, tome I, fascicule 2, p.322-3. Masson et Cie Editeurs 1965.

53. HESTRIN S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, an its analytical application : J. Biol. Chem. 180, 249-61 (1949)

54. HEWITT R., BREBBIA A. and WALETSKY E. - Carbamoyl alkyl phosphorodithioates as chemiotherapeutic agents : J. Econ. Ent. 51, 226-31 (1958)

55. HOBBIER F. - Chemical reactivation of phosphorylated human and bovine true cholinesterases : Brit. J. Pharmacol., 11, 295-303 (1956)

56. HOBBIER F.- Protection against the lethal effects of organophosphates by pyridine 2 aldoxime methiodide : Brit. J. Pharmacol., 12, 438-46 (1957)

57. HOBBIER F.- The inhibition of acetylcholine by organophosphorus compounds and its reversal : Proc. Roy. Soc. Med., 54, 403-5 (1961)

58. HOLMES R. and ROBINS E.L. - The reversal by oximes of neuromuscular block produced by anticholinesterases : Brit. J. Pharmacol., 10, 490-95 (1955)
59. HOLMSTEDT B. - Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors : Pharmacol. Revs., 11, 567-688 (1959)
60. HOLTZ P. und SCHÜMANN H.J. - Butyrylcholin in Gehirnextrakten : Naturwissenschaften, 41, 306 (1954)
61. JENSEN-HOLM J.- The cholinesterase activity, alone and in the presence of inhibitors at low substrate concentrations : Acta pharmacol. toxicol., 18, 379-97 (1961).
62. JENSEN-HOLM J., LAUSEN H.H., MILTHERS K. and MØLLER K.O. Determination of the cholinesterase activity in blood and organs by automatic titration. With some observations on serious errors of the method and remarks of the photometric determination : Acta pharmacol. Toxicol., 15, 384-94 (1959)
63. KALOW W. and GUNN D.R.- Some statistical data on atypical cholinesterase of human serum : Ann. human. Genet., 23, 239-50 (1959)
64. KENDALL S.B.- The use of organophosphorus compounds in veterinary medicine : Proc. Roy. Soc. Med., 54, 406-8 (1961)
65. KOELLE G.B. - Cholinesterases and anticholinesterases agents : Handbuch der experimentellen Pharmacologie, XV (1963)
66. KOELLE G.B. and GILMAN A.- Anticholinesterases drugs : J. Pharmacol. Expl. Ther., 95, 166-216 (1949)
67. LADELL W.S.S.- Physiological and clinical effects of organophosphorus compounds : Proc. Roy. Soc. Med., 54, 405-6 (1961)
68. LANGE W. und Von KRÜGER G.- Über Ester der Monofluorphosphorsäure : Ber. dtsch. chem. ges., 65, 1598-1601 (1932)
69. LINYUCHEV M.N.- Vop. Med. Khim., 6, 427 (1960). Résumé Chem. Abstr., 55, 8523 d (1961)
70. LOEWI O. - Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung : Pflügers Arch. ges. Physiol., 189, 239-42 (1921)
71. LOEWI O. und HELLAUER H. - Über das Acetylcholin in peripheren Nerven : Pflügers Arch. ges. Physiol., 240, 769-75 (1938)
72. MAC GREGOR W.S., RADELEFF R.D. and BUSHLAND R.C.- Some phosphorus compounds as systemic insecticides against cattle grubs : J. Econ. Ent., 47, 465-7 (1954)
73. MAC GREGOR W.S. and BUSHLAND R.C.- Tests with Dow ET 57 against two species of cattle grubs : J. Econ. Ent , 50, 246-9 (1957)

74. MAGAT A.-Etat actuel de la recherche sur la lutte contre l'hypodermose bovine : Bull. Doc et Inf. Centre Technique du Cuir n° 7-8-9, 173-6 (1964)
75. MAGAT A.- Commentaires sur les applications des composés organophosphorés en médecine vétérinaire : Bull. Soc. Vét. et Méd. comparée de Lyon, 66, 427-42 (1964)
76. MARCHAND J.F.- Microtests for cholinesterases. Interpretation after nerve gas or agricultural insecticide exposures : J. Am. Med. Assoc., 149, 738-40 (1952)
77. MENDEL B, MUNDELL D.B. and RUDNEY H.- Studies on cholinesterase. III Specific tests for true cholinesterase and pseudocholinesterase : Biochem J., 37, 473-6 (1943)
78. MENDEL B. and MYERS D.K.- Identification of pseudocholinesterase in the tissues of ruminants : Nature, 176, 783-4 (1955)
79. MENDEL B. and RUDNEY H.- Studies on cholinesterase. I. Cholinesterase and pseudocholinesterase : Biochem J., 37, 59-63 (1943)
80. MEYER A. und WILBRANDT W.- Zur Bestimmung der Aktivität der Cholinesterasen im menschlichen Blute : Helv. Physiol. Pharmacol. Acta., 12, 206-11 (1954)
81. MICHEL H.O.- Electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity : J. Lab. Clin. Med., 34, 1564-8 (1949)
82. MORAND P. et LABORIT H.- La mesure de l'activité cholinestérasique du sérum. Mise au point d'une méthode applicable à la clinique : Presse Méd., 55 (1), 131-2 (1947)
83. MYERS D.K.- Studies on cholinesterase. Species variation in the specificity pattern of the pseudocholinesterase : Biochem. J., 55, 67-79 (1953)
84. NACHMANSOHN D.- Chemical and molecular basis of nerve activity : New-York Academic Press 1959.
85. NACHMANSOHN D. and MACHADO A.L.- The formation of acetylcholine. A new enzyme "choline-acetylase" : J. Neurophysiol., 6, 397-404 (1943)
86. NACHMANSOHN D. and WILSON I.D.- The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine : Advanc. Enzymol., 12, 259-339 (1951)
87. O'BRIEN R.D.- Toxic Phosphorus Esters : New York Academic Press, Inc. (1960)
88. PLATTNER F. und HINTNER H. Die Spaltung von Acetylcholin durch Organextrakte und Körperflüssigkeiten : Pflügers Arch. ges. Physiol., 225, 19-25 (1930)
89. RADELEFF R.D. and WOODARD G.T.- Toxicological studies of Dow ET 57 in cattle and sheep : J. Econ. Ent., 50, 249-51 (1957)
90. ROBBINS W.E., HOPKINS T.L. and ROTH A.R.- Application of the colorimetric whole blood method to the measurement of bovine red blood cell cholinesterase activity : J. Econ. Ent., 51, 326-9 (1958)

91. ROGOFF W.M. and KOHLER P.H.- Effectiveness of Ruelene applied as localised "Pour-On" and as spray for cattle grub control : J. Econ. Ent, 53, 183-7 (1960)
92. ROSENBERGER G.- Ein neuer Weg des Dasselbekämpfung - erfolgreiche Behandlung der Rinder gegen die Wanderlarven : Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 19, 64-76 (1957)
93. ROTH A.R. and EDDY G. W. - Tests with Dow ET 57 against cattle grubs in Oregon : J. Econ. Ent., 50, 244-6 (1957)
94. RUCKEBUSCH Y. et RUCKEBUSCH M.- Mesure de l'activité cholinestérasique du sang chez les animaux domestiques : Rev. Med. Vét., 110, 627-638 (1959)
95. RUCKEBUSCH Y. et RUCKEBUSCH M.- Sur le système acétylcholine-cholinestérase et la pharmacologie des insecticides organophosphorés : Cah. Med. Vét. 30, 1-26, (1961)
96. SCHNEIDER J.- Techniques modernes de lutte contre l'hypodermose bovine : Thèse Doc. Vét. ALFORT, 1958.
97. SCHRADER G.- Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage von organischen Fluor-und Phosphorverbindungen : Monographie n° 62, 2. Aufl Weinheim : Verlag Chemie (1952)
98. STEDMAN E. and WHITE A.C. - A comparison of the cholinesterase activities of the blood sera from various species : Biochem. J., 27, 1055-60 (1933)
99. TAPERNOUX A. et MAGAT A.- Observations sur l'emploi du Ronnel pour le traitement interne de l'hypodermose bovine : Rev. Med. Vét., 112, 561-70 (1961)
100. TAPERNOUX A. et MAGAT A.- Essais de traitement de l'Hypodermose bovine par voie percutanée : Rev. Med. Vét., 114, 14-21 (1963)
101. TAPERNOUX A., VUILLAUME R. et MAGAT A.- Essais du diméthoate, du dichlorvos et du 11783 R.P. dans le traitement percutané de l'hypodermose bovine : Rev. Med. Vét., 114, 669-76 (1963)
102. TRUHAUT R. et VERNIN H. Microméthode de détermination de l'activité cholinestérasique vraie dans le sang total : Ann. Biol. Clin, 22, 419-28 (1964)
103. UMBREIT W.W., BURRIS R.H. and STAUFFER J.F.- Manometric techniques : Minneapolis. Burgess Publishing Company, (1957)
104. VENTUROLI M. e TUNIOLI L.- Determinazione della colinesterasi ematica in bovini normali ed in bovini sottoposti ad avvelenamento con parathion : Atti Soc. Ital. Sci. Vet., 13, 545-9 (1959)
105. VINCENT A.- Myiasés humaines à Hypoderme : Thèse Doc. Méd. PARIS N° 458 (1963)
106. VINCENT D. et SEGONZAC G.- Adaptation pratique de la méthode de HESTRIN au dosage de la pseudocholinestérase sérique : Ann. Biol. Clin., 16, 227-32 (1958)

107. VINCENT D. et SEGONZAC G.- Méthode pratique de dosage simultané des cholinestérases plasmatiques et globulaires dans le sang total : Ann. Biol. Clin., 23, 353-8 (1965)

108. WEBLEY D.J.- The determination of Fenchlorphos residues in milk : Analyst, 86, 476-8 (1961)

109. WILSON I.B. and BERGMAN F. - Studies on cholinesterase. VII. The active surface of acetylcholine esterase derived from effects of pH on inhibitors : J. Biol. Chem., 185, 476-89 (1950)

110. WITTER R.F. - A critical study of the manometric assay of cholinesterase in rat blood : Toxicol. Appl. Pharmacol. 4, 313-23 (1962)

111. WITTER R.F. - Measurement of blood cholinesterase : Arch. Environ. Health., 6, 537-63 (1963)

